

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

HODNOCENÍ EKOTOXICITY CHEMICKÝCH LÁTEK S VYUŽITÍM
ŘASOVÝCH TESTŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETRA OSINOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

HODNOCENÍ EKOTOXICITY CHEMICKÝCH LÁTEK S VYUŽITÍM ŘASOVÝCH TESTŮ

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF CHEMICALS USING ALGAL TESTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETRA OSINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0528/2009	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Petra Osinová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí práce	Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Hodnocení ekotoxicity chemických látek s využitím řasových testů

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na využití řasových testů a jejich aplikace v hodnocení ekotoxicity.
2. Analýza možností aplikace řasových testů pro hodnocení ekotoxicity látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 13.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Petra Osinová
Student(ka)

Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.
Vedoucí práce

Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na využití řasových testů při hodnocení ekotoxicity chemických látek. První část práce se podrobně zabývá studiem řas a metodikou řasového testu. Druhá část posuzuje vhodnost využití různých druhů řas a řasových testů pro ekotoxikologickou analýzu vybraných látek.

ABSTRACT

This bachelor thesis covers use of algal test for evaluation of ecotoxicity of chemical agents. First part details algae and algal tests methodology. Second part investigates applicability of different algae species and algae test methods for ecotoxicological analysis of selected chemical substances.

KLÍČOVÁ SLOVA

Řasy, řasový test, biotest, toxické sloučeniny

KEYWORDS

Algae, algal test, bioassay, toxic compounds

OSINOVÁ, P. *Hodnocení ekotoxicity látek s využitím řasových testů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 43 s Vedoucí bakalářské práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D. za pomoc a odborné konzultace během psaní mé bakalářské práce.

Obsah:

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Ekotoxikologie	6
2.2 Biotesty	6
2.3 Dělení testů toxicity	6
2.3.1 Podle délky doby expozice	6
2.3.2 Podle typu pokročilosti testovacího systému.....	7
2.3.3 Podle biologické úrovně	8
2.3.4 Podle biotopu testovacího organismu	9
2.4 Řasy.....	12
2.4.1 Význam řas pro ekotoxikologii	12
2.4.2 Charakteristika a taxonomie řas	13
2.5 Řasové testy	14
2.5.1 Rozdělení podle původu řas	14
2.5.2 Rozdělení podle uspořádání.....	15
2.5.3 Faktory ovlivňující řasový test	16
2.5.4 Použitelnost zkušební metody	19
2.5.5 Charakteristika testu	20
2.5.6 Udržování řasové kultury	20
2.5.7 Provedení testu.....	20
2.5.8 Podmínky testu	22
2.5.9 Podmínky validity zkoušky	22
2.5.10 Vyhodnocení řasového testu.....	22
2.5.11 Využití řasového testu v praxi	25
3. Aplikace testů	26
3.1 Kontaminanty ve vodním prostředí.....	26
3.1.1 Anorganické kontaminanty ve vodách	26
3.1.2 Organické kontaminanty ve vodách	26
3.2 Těžké kovy.....	27
3.2.1 Měď (Cu).....	27
3.2.2 Kadmium (Cd).....	27
3.2.3 Rtuť (Hg)	28
3.2.4 Zinek (Zn).....	28
3.2.5 Chrom (Cr).....	29
3.2.6 Olovo (Pb)	29
3.3 Využití řasových testů k zhodnocení toxicity těžkých kovů (kadmia a zinku).....	30
3.4 Léčiva.....	32
3.4.1 Diklofenak	32
3.4.2 Ibuprofen.....	33
3.5 Využití řasových testů k studii celkové toxicity směsí léčiv	33
4. ZÁVĚR.....	37
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	38
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	43

1. ÚVOD

Současná doba je označována jako doba velkého pokroku ve všemožných technologiích. Zároveň s rostoucí populací roste každoroční produkce odpadů a míra znečištění životního prostředí. Každoročně je vyprodukováno velké množství látek s dosud neprobádanými vlivy na živé organismy. Látky antropogenního původu narušují přirozený ekosystém a je potřeba znát jejich reakce s dalšími látkami a živými organismy. Tyto látky mohou ovlivňovat živé organismy několika způsoby. V prvním případě může docházet k přímým toxickým účinkům na organismy a rostliny. Dále může docházet k bioakumulaci, nebo může toxicky působit některý z metabolitů dané látky. Bioakumulací těžkých kovů v tkáních ryb se může nebezpečně zvýšená hladina těchto látek projevit i u člověka. Pro uspokojivé řešení této situace je nutné nejprve zjistit, jaké nepříznivé účinky mají cizorodé látky v prostředí. To je uskutečňováno pomocí živých organismů, které jsou vystaveny těmto látkám a jsou pozorovány jejich reakce na vybrané látky. Testy na živých organismech nazýváme biotesty a v naší práci se budeme podrobněji věnovat řasovým testům toxicity.

Řasy jsou primárními vodními producenty, a proto mají mezi biotesty nezastupitelné místo. Jsou základem potravního řetězce, a na jejich reakci závisí celý ekosystém. Tyto řasové testy jsou standardizovány podle evropských, ale i celosvětových norem. Jsou poměrně levným a rychlým ukazatelem komplexního znečištění a jejich obliba v ekotoxikologickém testování stoupá. V této práci se budeme zabývat hodnocením ekotoxicity s využitím řasových testů a tyto testy budou aplikovány na vybrané látky, významné zástupce nebezpečného antropogenního znečištění.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je obor, ve kterém se prolínají obory toxikologie a ekologie. Zabývá se působením cizorodých látek na volně žijící organismy v jejich přirozeném prostředí (ekologická toxikologie). Zahrnuje také přestup škodlivin na člověka ze všech prostředí (voda, ovzduší půda), nebo i prostřednictvím přirozených nebo člověkem řízených potravních řetězců, na jehož konci stojí. Při ekologických testech je jednoduchý organismus s dobře známými životními projevy, stavbou těla a fyziologií vystaven známé koncentraci známé látky v uměle připraveném prostředí. Z reakce organismu jsou zjištěna pravděpodobná rizika plynoucí z expozice sledované známé nebo i neznámé látky pro volně žijící populace. Dále je potřeba zahrnout i ovlivnění jinými organismy, které se daným organismem živí nebo jsou mu způsobem života (či metabolismem) příbuzní. Výsledky těchto testů mohou být využity k odhadu účinků sledované látky na člověka.[1]

2.2 Biotesty

V dnešní době jsme schopni provádět nejrůznější typy analytických metod. Tyto metody umožňují s vysokou přesností stanovit i velmi malá množství znečišťujících látek (kapilární chromatografie i v jednotkách 10^{-12} g), ale ani sebecitlivější přístroj nám však nepodá dostatečné informace o toxicitě jedovatých látek na živé organismy protože:

- Neznáme všechny biologické a chemické reakce probíhající v přírodních vodách
- Složení a koncentrace jednotlivých sloučenin nám neumožňuje přesně předpovědět toxický vliv na různé formy života
- V případě směsí dvou různých toxikantů nebývá toxický účinek vždy jen prostým součtem jednotlivých složek. Nelze předem určit, zda budou působit synergicky, antagonisticky, nebo se navzájem neovlivní.

Tyto nedostatky řeší současné využití biotestů (angl. „bioassay“). Biotest je biologická analytická metoda využívající živých organismů jako indikátor. Organismy jsou vystaveny působení vzorku v kontrolovaných podmínkách a po určené době expozice se posuzuje změna některého z životních projevů těchto organismů. [3]

2.3 Dělení testů toxicity

Testy ekotoxicky nadále dělíme podle různých kritérií. Jedná se například o délku doby testování, druh organismu a jeho životní prostředí. Dále rozlišujeme biologickou úroveň a uspořádání testovacího systému.

2.3.1 Podle délky doby expozice

Podle délky doby expozice dělíme toxikologické studie na krátkodobé (testy akutní toxicity) a dlouhodobé (testy subchronické a chronické toxicity). Druhy zvířat vhodné pro jednotlivé typy testů jsou přesně dané doporučeními OECD a českým lékopisem. Přesně určují, jaké množství látky aplikovat, dále také způsob aplikace a udávají, jaké informace musí obsahovat protokol o testaci. Doporučení OECD sjednocuje výsledky v ČR a ve světě. Chemické látky jsou testovány stejným způsobem a výsledky jsou snadno porovnatelné.

Akutní

Test akutní toxicity je rychlý test podávající spíše orientační informaci o toxickém účinku sledované látky. Patří k nejrozšířenějším standardním laboratorním testům. Doba trvání testů je 24 – 96 hodin. Tento test hodnotí účinky, které se projeví v krátké době po jednorázovém podání. Stanovuje se mortalita (úmrtí) jako LD₅₀ nebo LC₅₀ (udává se v mg · l⁻¹). Test akutní toxicity je závislý na typu expozice a tento údaj musí být spolu s charakterizací testu uveden u hodnoty stanovovaného indexu (orální, inhalační, -4hod., 8hod., atd.), protože bez těchto informací by hodnota neměla smysl. Akutní toxicita udává pouze relativní toxicitu podávané látky. Výsledky z testů na zvířatech mají pro člověka pouze omezenou platnost. [1,2,10]

Subakutní (subchronické)

Pro navození situace bližší člověku, mají následující testy delší trvání a pozorují se účinky po opakovaném podání. Toxické účinky látek se často neprojeví ani bezprostředně po opakovaném podání chemické látky. Mohou objevit mnohem později po opakované aplikaci a to v důsledku akumulace podávané substance v různých orgánech a tkáních. Subakutní testy trvají v rozmezí 28 – 90 dnů. K expozici dochází zpravidla jednou denně. Zároveň je prováděn test s kontrolní skupinou, se kterou musí být až na expozici zacházeno stejně jako s exponovanou skupinou. Tím se oddělí vlivy testované chemikálie od podmínek prostředí. Studie subchronické toxicity podávají více detailní informace než akutní testy, protože zahrnují i reverzibilitu toxických efektů. [1,2]

Chronické

Cílem chronických testů je charakterizovat účinky testované látky na organismus po jejím dlouhém opakovaném podávání v malých dávkách. K plánování chronických testů jsou využívány výsledky subakutního testu. Při chronických testech jsou organismy exponovány většinou po celý jejich dospělý život. Během testu jsou sledovány patologické změny pomocí vhodných bioindikátorů. Tyto bioindikátory indikují škodlivý účinek vybrané chemikálie. Kontrolní skupina musí mít stejný počet jedinců jako skupina exponovaná a je držena za stejných podmínek, kromě podávání testované chemikálie. Chronické testy nám podávají informace o dlouhodobém působení látky na živý organismus. [1,2]

2.3.2 Podle pokročilosti testovacího systému

Podle pokročilosti testovacího systému dále dělíme na testy 1. generace. Jedná se o původní normou standardizované testy. Dále rozlišujeme testy 2. generace, jedná se o novější

mikrobiotesty. Posledním typem testů jsou testy 3. generace, tzv. biosenzory a biofondy.

Testy 1. generace

Tyto testy jsou představovány klasickými, standardními a konvenčními metodikami, které jsou založené na akutních testech toxicity. Jsou prováděny na v laboratoři chovaných organismech a udržovaných kulturách. Rozeznáváme čtyři základní typy testů podle norem ČSN EN ISO:

- 96-hodinový test na rybách (ČSN EN ISO 7346-2)
- 48-hodinový imobilizační test na dafniích (ČSN EN ISO 6341)
- 72-hodinový inhibiční test na řasách (ČSN EN ISO 8692)
- 72-hodinový test klíčivosti a růstu kořene hořčice (dle věstníku MŽP 4/2007) [4,13]

Velkou předností těchto biotestů je, že jsou uznávané mezinárodními legislativami. Jejich nevýhodou je dosti náročné provedení. Kultury testovacích organismů je totiž nutno dlouhodobě udržovat a zajišťovat nároky živočichů na potravu a prostor (akvária, 250ml Ehrlenmayerovy baňky). Dále je spotřebováváno velké množství testovaného materiálu a do práce musí být zapojeno více zaměstnanců nebo je potřeba delší pracovní doba. Velmi náročná je i péče

o matečné kultury a mytí laboratorního skla. Proto se následující generace mikrobiotestů jeví jako zajímavá alternativa k standardním testům toxicity. [36]

Testy 2. generace (mikrobiotesty)

V současné době prožívá tato generace testů bouřlivý rozvoj. Druhou generaci testů představují alternativní biotesty (mikrobiotesty).

Mikrobiotesty nabízejí odezvu na rostoucí potřebu testovat nové chemické látky a vzorky z životního prostředí ve velkých sériích. Tyto testy jsou miniaturizované (jako testovací nádobky se používají zkumavky, kyvety nebo mikrotitrační destičky. [36,39]

Mezi přednosti těchto biotestů patří:

- Miniaturizace
- Zjednodušení a možnost alternací při vyhodnocování testu
- Zlevnění testů
- Zapojení biotestů, které reprezentují různé trofické úrovně v ekosystému
- Přehodnocování standardních testů (ISO, OECD, EPA atd.)
- Nové vědecké poznatky (uchovávání řasových kultur, řízení produkce klidových stádií)
- Zkrácení doby inkubace při zachování citlivosti systému
- Je vyvíjen tlak na validaci výsledků biotestů a jejich standardizace. Dále je vyvíjen tlak na ekologickou relevanci a realistickou interpretaci výsledků [39]

Testovací organismy využívané v mikrobiotestech představují bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí, rybí tkáňové kultury, atd. Při testování jsou využívána klidová stadia těchto organismů. V případě testů na bezobratlých (perloočky, vířníci) se používají cysty (vířníci) a ehipia (Dafnie), při testech na rybách jsou aplikovány tkáňové kultury a jikry, při testech na bakteriích se používají jejich lyofilizované kultury. V řasových testech jsou využívány imobilizované a hluboce zamražené řasové kultury. Takto jsou organismy uchovávány a mohou se oživit bezprostředně před vlastním testováním. [18,39]

Testy 3. generace (biosenzory a biofondy)

Zatím nejnovějším typem biologických testů jsou biosenzory a biofondy. Tyto testy jsou dnes již reálně aplikovány v mnoha laboratořích a přesunuly se tak z oblasti výzkumu do praxe. Zjišťují se především specifické mechanismy toxických vlivů (oxidativní stres, metalothioniny, mechanismy hormonální regulace, specifické buněčné kultury pro specifické organismy). Tyto testy se do budoucna jeví jako vhodným doplňkem při screeningových studiích k mikrobiotestům a standardním testům. [13,18,39]

2.3.3 Podle biologické úrovně

Podle biologické úrovně rozlišujeme testy na úrovni buněk a tkání, organismů a společenstev (biocenóz).

Na úrovni buněk a tkání

Testy na úrovni buněk slouží především k teoretickému objasnění účinků toxických látek. V poslední době jsou tkáňové kultury využívány i pro rutinní provádění testů toxicity. Výhodou těchto testů je vysoká citlivost a reprodukovatelnost. Další výhodou jsou nízké časové nároky. Nevýhodou je, že tento systém není schopen suplovat enzymaticko-imunitní systém živého organismu, a tudíž je výsledek testu toxicity platný pouze pro danou tkáň. Nemůžeme z testu usoudit účinky na organismus jako celek. Tyto testy je však vhodné provádět jako screening před provedením testů na živých organismech. [4,21]

Na úrovni jedinců (organismů)

Tyto testy jsou v současnosti nejvíce používány, ačkoliv stále přetrvávají určité potíže s reprodukovatelností. Jsou využívány při hodnocení akutní, případně chronické toxicity látek. Organismy vybírané pro tyto testy postihují jednotlivé trofické úrovně ve vodním prostředí. Prakticky to znamená 4 úrovně (baktérie, řasy, planktonní organismy a ryby).

Odpověď jednotlivých organismů na přítomnost toxických látek nejsou jednotné, ovlivňuje ji mnoho faktorů, jako je dosažitelnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace a schopnost polutant odbourávat.

Je důležité, aby při ekotoxikologickém monitoringu nebyly vyvozeny závěry pouze z testování na jednom druhu organismu. [4,21]

Na úrovni společenstev (biocenóz)

Na úrovni biocenóz je sledován toxický účinek v přírodě nebo na modelu, nevýhodou je, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně. Organismy mohou mít různé reakce na narušení jejich potravních řetězců. [21]

2.3.4 Podle biotopu testovacího organismu

Dále testy rozdělujeme podle organismů a jejich životního prostředí. Organismy obývající půdu (terestrické) a organismy obývající vodní prostředí (aquatické). U rostlin sledujeme takzvanou inhibici (zpomalení či úplné zastavení růstu). U živočichů je sledovanou vlastností imobilizace (znehynění) či mortalita.

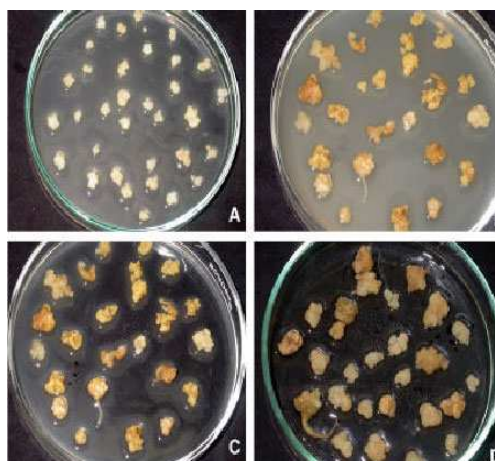
Terestrické

- Test inhibice růstu kořene *Hořčice bílé* (*Sinapis alba*). Tento test byl vyvinut pro sledování účinků odpadních vod na závlahy. Při této zkoušce je využívána citlivost klíčících semen hořčice bílé. Test trvá 72 hodin a na jeho konci je změřena délka kořene každé rostliny u jednotlivých koncentrací. Poté se vyhodnocuje inhibice podle stejného výpočtu jako u řasových testů s tím rozdílem, že růstová rychlost je nahrazena aritmetickým průměrem kořene. Výstupem testu je stanovení hodnoty IC_{50} . [9,21]



Obr. 1: *Sinapis alba* [27] [28]

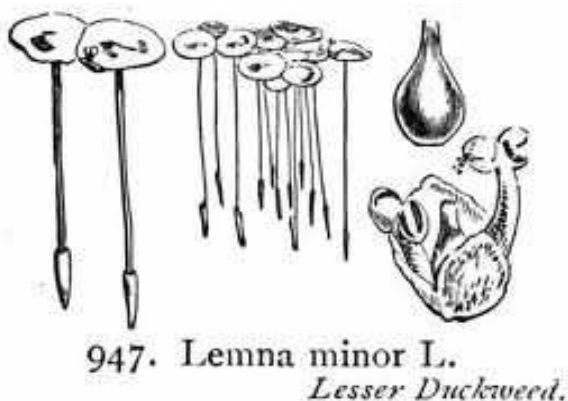
- Test inhibice růstu kořene *Cibule kuchyňské* (*Allium cepa*) Probíhá obdobně jako test na hořčici bílé. Cílem je stanovit inhibiční účinek zkoumané látky na růst kořene cibule kuchyňské. Test se provádí v počátečních stádiích vývoje rostliny. [9,21].



Obr. 2: *Allium cepa* [59] [23]

Akvatické

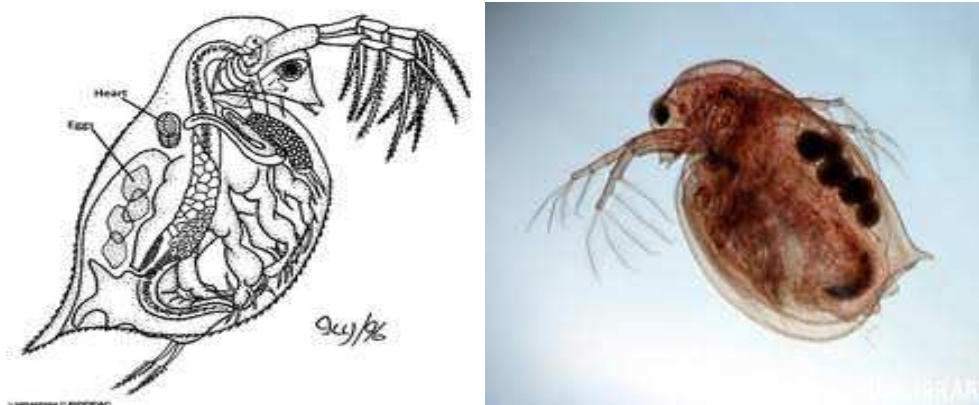
- Test toxicity na *Okřešku menším* (*Lemna minor*). Cílem tohoto testu je stanovit akutní toxicitu. Testování trvá 168 hodin. Během testu se jednou za tři dny hodnotí vzhled lístků a jejich počet. Vyhodnocení je obdobné jako u řasových testů. Pouze s tím rozdílem že počet buněk je nahrazen počtem lístků. Na konci testu je vyhodnocena hodnota IC_{50} . [9,21]



Obr. 3: *Lemna minor* [58] [57]

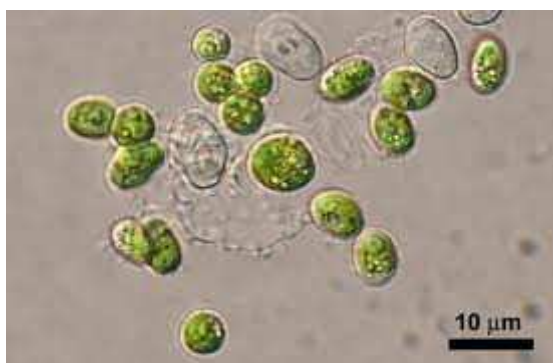
- Test toxicity na koryši *Daphnia magna*. Tato metoda je standardizována podle ČSN EN ISO 6341 a zjišťuje se pomocí ní inhibice perlooček. V tomto testu se pozoruje účinek vodou vyluhovatelných látek na imobilizaci a mortalitu. Test probíhá po dobu 48 hodin bez osvětlení, aerace a krmení organismů. Během testu je zaznamenáván úhyn či imobilizace

po 24 a posléze po 48 hodinách. Výstupem tohoto testu je zjištění hodnoty efektivní koncentrace EC_{50} . [9,21]



Obr. 4: *Daphnia magna* [27] [26]

- Zkouška toxicity na chlorokální řase *Desmodesmus subspicatus*. (ČSN EN ISO 8692). Principem testu je stanovení toxického účinku vodou vyluhovatelné látky pomocí inhibice růstu a rozmnožování chlorokální řasy. Podstata této zkoušky bude podrobně rozebrána v kapitole řasové testy. [9,21]



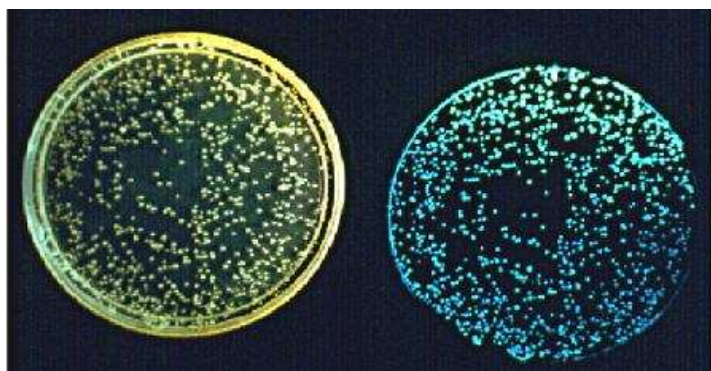
Obr. 5: *Desmodesmus subspicatus* [25]

- Test toxicity na rybách *Poecilia reticulata* (živorodka duhová) či *Brachydanio rerio* (*Danio pruhovaný*). Podle norem ČSN EN ISO rozlišujeme několik testovacích metod. ČSN EN ISO 7346-1 (statická metoda), ČSN EN ISO 7346-2 (obnovovací metoda), ČSN EN ISO 7346-3 (průtočná metoda). Test probíhá za standardizovaných podmínek po dobu 48 hodin. Podle metodik ISO se prodlužuje až na 96 hodin. V průběhu testu se zaznamenává chování ryb, měří se pH, koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota. Výstupem tohoto testu je zjištění hodnoty LC_{50} . [9,21]



Obr. 6: *Poecilia reticulata* a *Brachydanio rerio* [33,34]

- Bakteriální bioluminiscenční test toxicity na *Vibrio fischeri*. Tato metoda je založena na sledování změny v luminiscenci mořských světélkujících bakterií. Je sledována relativní inhibice bioluminiscence způsobená vystavením toxické látky. Jedná se o velmi rychlý test, trvá 15 minut. Každých 30 až 60 sekund je měřena intenzita emitovaného světla lumino-metrem. Vyhodnocením testu se zjistí inhibiční koncentrace IC_{50} . [9,21]



Obr. 7: *Vibrio fischeri* [35]

2.4 Řasy

Řasy jsou hlavními producenty živé hmoty (biomasy) a také producenty kyslíku ve všech vodních biomasách. Jsou hojně využívány člověkem jako potrava hnojivo nebo krmivo pro zvířata. Dále jsou využitelné jako zdroj významných látek jako je agar karagen a jod. V neposlední řadě jsou využívány také jako palivo. [5]

2.4.1 Význam řas pro ekotoxikologii

Moderní biotesty, mezi které patří řasové testy, nám pomocí reakce jednoduchého organismu rychle předpoví pravděpodobné účinky toxické látky nebo i směsi. Neodhalí nám sice přesné analytické složení neznámé skupiny látek, ale zato nám umožní zjistit, jaký vliv bude mít kombinace více toxických látek na živý organismus. Biotesty jsou tedy velmi vhodným doplněním analytických testů. V rámci biotestů je využíváno více organismů. Řasa je z našeho pohledu zajímavá hlavně proto, že stojí úplně na začátku potravního řetězce a její reakce na toxické látky (úhyn, metabolická přeměna toxické látky) ovlivňují další organismy v potravním řetězci.

Z tohoto hlediska jsou řasy zajímavější než perloočka a ryby, která jsou také využívána pro biotesty, ale v potravním řetězci stojí až za řasou, tudíž jsou její reakce na toxické látky ovlivněna.

2.4.2 Charakteristika a taxonomie řas

V taxonomickém systému řadíme řasy spolu se sinicemi do skupiny Microphyta (mikroskopicky pozorovatelné organismy). Sinice pak řadíme jako organismy prokaryotické (jádro bez jaderné membrány). Řasy patří mezi organismy eukaryotické (jádro s jadernou membránou). [8]

Dále řasy řadíme mezi nižší rostliny (Thallobionta). To jsou rostliny, jejichž tělo je tvořeno stélkou (thallus). Mají jednobuněčné nebo vícebuněčné tělo, u kterého nerozlišujeme stonek, listy, nebo rhizoidy. Podle obývaného biotopu dále rozlišujeme řasy fytoplanktonní, osidlující volnou vodu. Tyto řasy se vznášejí buď pasivně, nebo se pohybují za pomoci brv a bičíků. Dále perifytonní, které tvoří nárosty na kamenech, ponořených rostlinách a dalších substrátech. Posledním případem jsou řasy bentické, které obývají dno.

Z hlediska biotestů jsou nejzajímavější skupinou zelené řasy, které jsou nejpoužívanějším druhem vodních řas pro zkoušku inhibice. [8]

Tab. 1. Stručná taxonomie řas [15]

Oddělení:	Třída:
<i>Rhodophyta</i> (ruduchy)	<i>Rhodophyceae</i>
<i>Dinophyta</i> (obrněnky)	<i>Dinophyceae</i>
<i>Cryptophyta</i> (skrytěnky)	<i>Cryptophyceae</i>
<i>Chromophyta</i>	<i>Crysophyceae</i> (zlativky)
	<i>Bacillariophyceae</i> , syn. <i>Diatomae</i> (rozsvivky)
	<i>Xanthophyceae</i> (různobrvky)
<i>Euglenophyta</i> (krásnoočka)	<i>Euglenophyceae</i>
<i>Chlorophyta</i> (zelené řasy)	<i>Chlamydomonadophyceae</i> (chlamydomonády)
	<i>Chlorophyceae</i> (zelenivky)
	<i>Ulvophyceae</i> (vláknité zelené řasy)
	<i>Zygnematophyceae</i> (spájkivé řasy)
	<i>Charophyceae</i> (parožnatky)

Zelené řasy (oddělení chlorophyta)

Do této skupiny patří všechny normou stanovené testovací organismy ke zkoušce inhibice sladkovodních řas. Nejvýraznějším charakteristickým znakem této skupiny řas je zelené zbarvení. To způsobují asimilační pigmenty tvořené chlorofylem-a chlorofylem-b a beta-karoteny a xantofyly (neoxantin, lutein, violaxantin a zeaxantin).

V chloroplastu se nachází pyrenoid, bílkovinné tělísko, které je pokryté škrobovými zrny (obsahují enzym 1,5-ribulózobifosfát karboxylázy, který váže oxid uhličitý v temné fázi fotosyntézy). Jako zásobní látka je využíván 1,4-glukan a polyfosfátové granule volutinu. Povrch

buňky tvoří polysacharidy (sporopolenin), hemicelulóza, pektin a sliz, který umožňuje pomalý pohyb, pokud je vylučován póry. [8,38]

2.5 Řasové testy

Řasové testy toxicity slouží k testování toxických účinků látek a vzorků na vodní producenty. Běžně používané zelené řasy patří do skupiny necévnatých rostlin a jsou hojně zastoupeny v našich vodách. Tyto řasy představují důležitý článek potravního řetězce a ovlivňují také další organismy, které stojí v potravním řetězci za nimi. Tyto testy nám umožňují sledovat toxické účinky látek, které se projeví inhibicí růstu. [19,29]

Dále také můžeme sledovat stimulační efekty, takzvanou úživnost. Díky rychlému růstu řas je možné zjišťovat akutní, ale i chronické působení toxických látek. Rozeznáváme několik různých typů řasových testů. Jednotlivé modifikace se liší:

- objemy, se kterými je řasový test prováděn
- druhem použitého organismu
- různým složením růstových médií
- délkou doby testování

Principy všech typů řasových testů jsou však podobné:

- Sleduje se účinek toxické látky.
- Jsou pozorovány inhibiční nebo stimulační účinky (úživnost) toxické látky na řasovou kulturu.
- Cílem řasového testu je stanovit hodnoty EC_{50} , LC_{50} , IC_{50} , nebo další hodnoty jako jsou $NOEC$ a $LOEC$.

EC_{50} Statisticky odvozená koncentrace látky, u které se předpokládá, že způsobí určitý efekt (snížení měřené životní funkce, např. snížení růstu, změna chování apod.) u 50% testovaných organismů dané populace za definovaných podmínek ve srovnání s kontrolou. Je nejužívanější hodnotou, pomocí níž jsou srovnávány toxické účinky látek na řasy.

LC_{50} Představuje koncentraci zkoušené látky, která má za následek 50% úhyn testovacích organismů

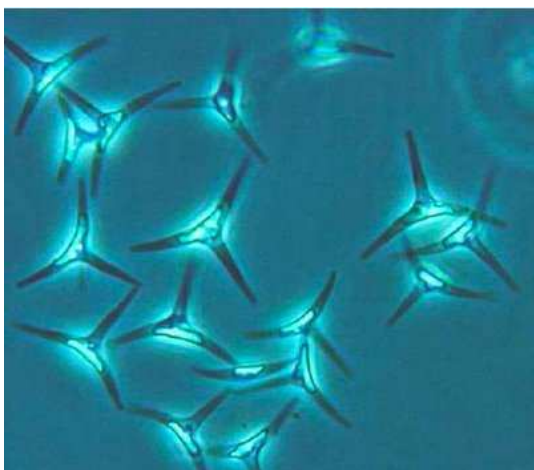
IC_{50} Představuje koncentraci zkoušené látky, která má za následek 50% snížení růstu organismů.

$NOEC$ Nejvyšší zkušební koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky vzhledem ke kontrole.

$LOEC$ Nejnižší zkušební koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky ve srovnání s kontrolou. [1,9,17,24]

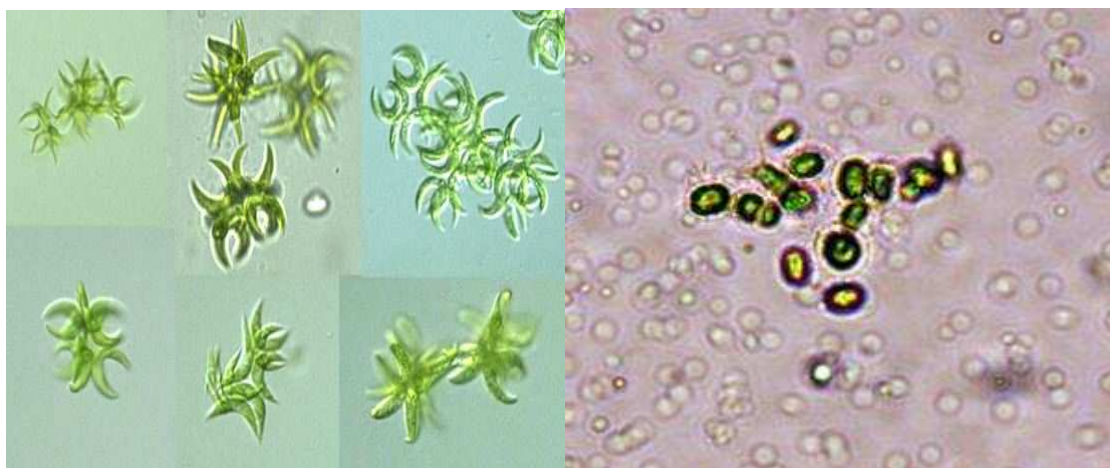
2.5.1 Rozdělení podle původu řas

Řasové testy s mořskými řasami (algal marine bioassay ISO 10273) využívají rozsivku *Phaeodactylum Tricornutum*.



Obr. 8: *Phaeodactylum Tricornutum* [54]

K provedení řasového testu na sladkovodních řasách (ISO ČSN EN 8692, OECD 201) je využívána řasa *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*. [13]



Obr. 9: *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus* [24,16]

2.5.2 Rozdělení podle uspořádání

Klasické uspořádání

Řadíme sem standardní řasový test (1. generace). Kultivace je realizována v 250 ml Ehrlen-mayerových baňkách po dobu 72 hodin. Každých 24 hodin se měří růst kultury. Ten můžeme změřit pomocí počítací částic nebo spektrofotometricky. Z takto získaných hodnot vypočteme růstovou inhibici řas a zjistíme hodnotu EC_{50} . [13]

V mikrodestičkovém uspořádání

Tyto testy probíhají v 96-jamkových sterilních mikrodestičkách. Do každé jamky (o objemu 300 μ l) je postupně pipetováno 250 μ l daného roztoku. Expozice trvá 72 hodin při teplotě 27 ± 2 °C a osvětlení v rozmezí 6000 – 10 000 lux. Vyhodnocování se provádí pomocí měření absorpance mikrodestičkovým readrem. Výsledkem testu je křivka, která vyjadřuje poměr dávka/odpověď, která je vyjádřena v procentech inhibice. Tento typ testu jsme vybrali jako modelový a bude pomocí něj vysvětleno celé provedení testu. [19]

Alternativní mikrobiotesty

Tyto testy jsou také nazývány miniaturizované z důvodu malých objemů potřebných k testování. Díky menší spotřebě roztoků a sníženému požadavku na prostory a vybavení můžeme provádět více paralelních testů. V tomto testu jsou využita klidová stadia testovacích organismů (vajíčka, cysty, lyofilizované a imobilizované kultury organismů). Miniaturizovaná verze řasového testu se nazývá algaltoxkit. [21]

Algaltoxkit

V tomto typu testu jsou využívána klidová stadia řas, které vytváří tzv. korále. Velikost jednoho korálu je asi 2 mm a obsahuje kolem 1 milionu řasových buněk. Převedení z imobilizovaného do aktivního stavu trvá 30 minut a samotný test se provádí po dobu 72 hodin. Během testu se sleduje růstová inhibice mikroskopických řas. Pomocí spektrofotometru je změřena optická hustota řas při vlnové délce 670 nm. Optická hustota je zaznamenávána vždy po 24 hodinách a z takto získaných hodnot se vypočte hodnota EC_{50} .

Jedno balení algaltoxkitu již obsahuje všechny pomůcky potřebné k testování. Dále brožuru s přesným postupem a ilustracemi pro dva 72hodinové inhibiční testy. [22,56]

2.5.3 Faktory ovlivňující řasový test

Přirozené prostředí výskytu testovacího organismu je charakterizováno vnějšími podmínkami, které na organismus působí. Mezi tyto podmínky patří teplota, ozáření, dostupnost vody, pH, salinita nebo minerální živiny. Při provedení řasového testu jsou dodržovány pevné podmínky a jejich změna může ovlivnit test mnohdy nepředvídatelným způsobem. [55]

Živné médium

Živná media jsou velmi důležitou součástí vlastního testování. Jedná se o směs vody živin a zkoušeného vzorku. V této směsi jsou řasové buňky inkubovány a je použita pro předkultivaci a kontrolní vzorky. Voda použitá k přípravě růstového média musí být neionizovaná, nebo podobné čistoty. Roztoky živin pro růstové médium se připraví podle následující tabulky OECD. Médium standardizované podle ČSN EN ISO je shodné s médiem doporučovaným OECD.

Rozdíly jsou patrné mezi médiem podle ESA a médiem podle OECD, a to jak ve skladbě živin, tak ve výsledné hodnotě pH. [13,45]

Tab. 2: Složení růstového média podle (US. EPA) a OECD TG 201 [45]

Sloučenina	EPA [mg · l ⁻¹]	OECD [mg · l ⁻¹]
NaHCO ₃	15,00	50,00
NaNO ₃	25,50	
NH ₄ Cl		15,00
MgCl ₂ · 6(H ₂ O)	12,16	12,00
CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	4,41	18,00
MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	14,60	15,00
K ₂ HPO ₄	1,04	1,60
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	16,0 · 10 ⁻²	0,080
Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	30,0 · 10 ⁻²	0,10
H ₃ BO ₃	18,6 · 10 ⁻²	0,19
MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	41,54 · 10 ⁻²	0,42
ZnCl ₂	32,70 · 10 ⁻⁴	30,0 · 10 ⁻⁴
CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	14,28 · 10 ⁻⁴	15,0 · 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	72,60 · 10 ⁻⁴	70,0 · 10 ⁻⁴
CuCl ₂ · 2(H ₂ O)	12,00 · 10 ⁻⁶	10,00 · 10 ⁻⁶
pH	7,5	8,3

Touto normou doporučené médium může být nahrazeno jiným modifikovaným médiem, pokud budou dodrženy určité podmínky. Doporučené médium i alternativní médium musí splňovat tyto požadavky (podle tab. 3)

Tab. 3: Požadavky na složení růstového média [37]

P	≤ 0,7 mg · l ⁻¹
N	≤ 10 mg · l ⁻¹
Cheláty	≤ 10 ⁻³ mmol · l ⁻¹
Celková tvrdost (Ca, Mg)	≤ 0,6 mmol · l ⁻¹

Pro sladkovodní řasy jsou u nás využívány i další média. Patří sem Gaffronův roztok stopových prvků, který při dodržení vhodných podmínek (bez osvětlení, s teplotou udržovanou na 4 °C) můžeme udržovat i několik let. [19]

Tab. 4: Gaffronův roztok pro mikrobiotesty [29]

Chemikálie	Koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
H_3BO_3	3100
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230
$\text{Na}_2\text{VO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	88
KBr	119
KI	83
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	154
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	146
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	125
$\text{NiSO}_4 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	198
$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37
$\text{V}_2\text{O}_4(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$	35
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \text{ K}_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	474

Tab. 5: Roztok stopových prvků podle Gaffrona [29]

Chemikálie	Koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
NaNO_3	467
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	59
K_2HPO_4	31
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
Na_2CO_3	21
FeCl_3	1
	Koncentrace [$\text{ml} \cdot \text{l}^{-1}$]
Gaffronův roztok	0,08

Dalším možným médiem je roztok podle Knoppa. Tento roztok se získá z níže uvedených chemikálií, z nichž jsou připraveny zásobní roztoky, které se posléze naředí vodou dle tabulky. [21]

Tab. 6 Roztok podle Knoppa [21]

Zásobní roztok	Chemikálie	Navážka / Objem vody	Použitý objem zásobního roztoku na 1000 ml ředící vody	
č.1	HNO_3	10 g / 1000 ml	10 ml	Vše postupně nadávkovat a objem doplnit do 1000 ml
č.2	K_2HPO_4	1 g / 1000 ml	10 ml	
č.3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g / 1000 ml	10 ml	
č.4	FeCl_3	0,1 g / 1000 ml	1 ml	

Teplota, Osvětlení a pH

Dle normy ČSN EN ISO 8692 je požadovaná teplota pro řasový test 23 stupňů $\pm 2^\circ\text{C}$. Podle OECD by teplota měla být $21 - 25 \pm 2^\circ\text{C}$. Pro druhy *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata* je tato teplota nízká, je zavedeno rozmezí $27 \pm 2^\circ\text{C}$, které vyhovuje těmto druhům. Teplota přesahující tento rozsah může vést k nestandardnímu chování organismu a tím možnému znehodnocení testu. Je proto důležité zohledňovat specifické fyziologické vlastnosti řas.

V průběhu expozice je potřeba kromě teploty dodržet stálé osvětlení. Osvětlení je zajišťováno prostřednictvím termoluminostatu a to v rozmezí 6000 – 10 000 lux.

Dalším sledovaným faktorem je pH, které by se v průběhu testu nemělo měnit. Zvýšením pH o víc než 1,5 je podle normy ISO 8692 považuje test za neplatný. Důvodem je, že pH může měnit toxicitu těžkých kovů a to zvyšovat i snižovat.

Všechny tyto hodnoty mají vliv na výsledky testů toxicity, protože obecně ovlivňují formu výskytu (chemickou strukturu) látky a tím pádem i toxicitu dané struktury. Změnou některého z těchto parametrů by látka mohla reagovat za vzniku méně či více toxického produktu. [13,20,36,37]

Mineralizace

Bylo zjištěno, že salinita prostředí má výrazný vliv na toxicitu kovů. O vlivu salinity na toxicitu kovů vůči vodním organismům (řasám) je doposud známo málo informací. Byla provedena studie na kombinovaný vliv salinity a těžkých kovů na několik druhů planktonních řas (*Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina*, *Scenedesmus armatus* a *Stichococcus bacillaris*).

Studie byla provedena s jednotlivými druhy řas na různě koncentrovaných vzorcích. V rozmezí salinity 0-32 ‰. Těžké kovy (Zn, Cd, Co, Cu, Mn, Ni a Pb) vykazovaly snižující se hustotu řasových buněk se stoupající koncentrací kovu bez ohledu na salinitu. U vzorku obsahujícího Ni a Zn bylo pozorováno výrazné snížení růstu buněk v závislosti na rostoucí salinitě. Ve vzorku obsahujícím Pb salinita způsobila vzrůst toxického účinku kovu na řasu *Scenedesmus armatus* a *Oocystis submarina*. S vlivem mineralizace na výsledek řasového testu je tedy nutno počítat. [6,7]

Inokulum

Je charakterizováno jako množství buněk vložených do testovacích baněk na začátku řasového testu (vyjadřuje se pomocí počtu buněk v 1 ml). Inokulum se nasadí k předkultivaci 2 dny před začátkem samotné zkoušky. Tato inokulační kultura je provzdušňována a uchovává se při stálých světelných (6000 lux) a tepelných ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) podmínkách. Pro zkoušku se inokulum odebírá z exponenciálně rostoucí kultury. Koncentrace inokula na počátku testu by měla být co nejnižší, a to proto, aby se do testu zaneslo co nejméně živin a co nejvíce buněk se rozmnožilo až pod vlivem zkoušené látky. [9,36]

2.5.4 Použitelnost zkušební metody

Podle normy ČSN EN ISO je metoda stanovení inhibice růstu použitelná pro látky snadno rozpustné ve vodě.

Dále je vhodné znát tyto informace:

- Tlak páry
- Strukturní vzorec
- Chemickou stabilitu ve vodě a na světle
- Metody analýzy kvantitativního stanovení látky ve vodě

- Hodnotu pKa
- Hodnotu rozdělovacího koeficientu voda-oktanol
- Výsledky snadnosti biorozložitelnosti [13,37]

2.5.5 Charakteristika testu

Test spočívá v měření nárůstu koncentrace biomasy řas v jednotlivých testovaných koncentracích toxického vzorku. Posléze je provedeno srovnání s kontrolou, která je tvořena živným médiem. Kultivace řas probíhá za stálých světelných i teplotních podmínek. Existuje několik typů uspořádání testu podle doby expozice. Test může být uspořádán jako akutní (cca 72 hodin), semichronický (cca 96 hodin), či chronický (více než 96 hodin). [29]

2.5.6 Udržování řasové kultury

Zásobní kultury se pěstují v zábrusových bankách a vyžadují stálou aeraci. Přiváděný vzduch je potřeba vyčistit od volně poletujících bakterií v okolním prostředí. Toto je zajišťováno pomocí bakteriálního filtru a teprve poté je vzduch veden do řasové suspenze. Přívodem vzduchu je zajištěn dostatek CO₂, který kultura nezbytně potřebuje pro správný růst.

Kmenová kultura se udržuje na 1,5% agaru ve standardním živném médiu při laboratorní teplotě, na nepřímém denním světle. [29,19]

2.5.7 Provedení testu

Jelikož se provedení jednotlivých modifikací řasových testů v detailech liší a nemůžeme se v této práci věnovat všem, vybraly jsme jako modelový test řasový mikrobiotest. Ostatní typy testů se sice liší, ale princip a zjištěné výstupní hodnoty jsou shodné.

Nejprve je připravena zásobní kultura. Je nutné, aby předkultivace probíhala za stejných podmínek (teplota, osvětlení, složení média podle tabulky) jako vlastní test. V exponenciální fázi růstu se řasová kultura naředí na požadovaných 400 000 buněk · ml⁻¹, čímž je připravena pro vlastní test. Hustota zásobní řasové kultury se stanoví počítáním buněk pomocí počítací komůrky Cirrus 2.

Pomocí mikroskopu se pozorováním určí počet buněk v cca 20 čtvercích. Ze známého objemu jednotlivých čtverců se přepočte získaný průměrný údaj o počtu buněk ve čtvercích na koncentraci řas v ml. Následuje příprava koncentrační řady testované látky. Vzorek je naředěn médiem používaným ke kultivaci řas (viz kapitola média). Odměrné banky se naplní ze 2/3 kultivačním médiem, poté se přidá požadované množství vzorku a vše je důkladně promícháno. Inokulum se dává tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 10 000 ks · ml⁻¹. Poté je banka naplněna médiem po rysku a opět je potřeba důkladného promíchání.

Dále je potřeba připravit kontrolní suspenzi, tzv. kontrolu, která obsahuje pouze médium a inokulum. Během testu se průběžně měří koncentrace řasové suspenze pomocí spektrofotometru.

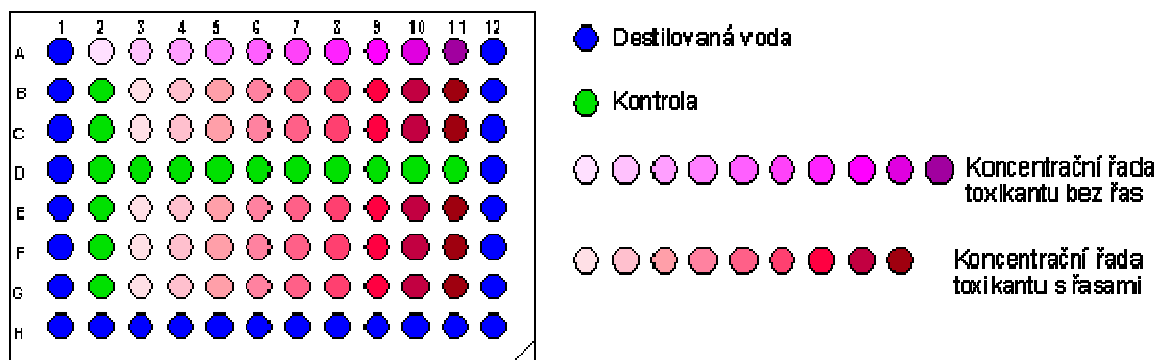
Kromě řas absorbuje záření také médium a vzorek. Mohlo by tedy dojít k pozitivní chybě. Té můžeme předejít odečtením absorbance jednotlivých testovaných koncentrací bez obsahu řasy. Je tedy nutné připravit další koncentrační řadu vzorku stejnou jako pro testování toxicity, ale bez přísadky inokula. [19]

Připravené koncentrace se poté dávkuje po 250 ml do jamek v destičkách. Vzhledem k rychlé sedimentaci řas je potřeba roztok před pipetováním vždy řádně promíchat.

Dávkování roztoku do jamek v destičce probíhá podle níže uvedeného schémata. Do jamek A2 – A11 je vpraven toxikant bez inokula, jehož koncentrace se zvyšuje směrem zleva doprava. V jamce A2 je nachází médium bez toxikantu. V sloupci číslo 2 a jamce B – G a celém řádku D se nachází kontrola.

Do sloupce 3 – 11 a rozmezí řádků B – G se pipetují testované koncentrace a ty vzrůstají zleva doprava. V jednotlivých sloupcích se nachází roztok vždy o stejné koncentraci. Jamky po obvodu mikrotitrační destičky se naplní destilovanou vodou. Nakonec je celá destička překryta parafinem a víčkem. Expozice probíhá podle stanovených podmínek (viz kapitola 2.5.8)

Každých 24 hodin je potom vyhodnocována hustota řasové kultury pomocí spektrofotometru až po dosažení stacionární fáze. Ze změřených absorbancí za pomoci kalibrační křivky jsou pak vypočteny koncentrace řas v roztoku. [19]



Obr. 10: Schéma dávkování roztoků do jamek mikrotitrační destičky [19]

Rozeznáváme několik způsobů měření hustoty řasové kultury. Jednou z možností je měření absorbance při vlnové délce 671 nm. Změřená hodnota odpovídá množství chlorofylu. Předností tohoto testu je skutečnost, že není ovlivněn přítomností bakterií a nerozpuštěných částic. Měření zákalu při 750 nm je další metodou měření hustoty kultury. Ta vychází z toho, že obsah chlorofylu není nejpřesnější ukazatel, protože v řasách probíhají přirozené fyziologické pochody, při kterých se koncentrace chlorofylu mění.

Je potřeba sestavit samostatné konverzní křivky pro různé druhy řas a různé podmínky kultivace. Pomocí konverzní křivky se naměřená absorbance převede na koncentraci řasových buněk v roztoku a poté je vyhodnocena inhibice růstu biomasy řas. [19,36]

2.5.8 Podmínky testu

Tab. 7 Podmínky testu [19]

Testovací organismus:	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (<i>Scenedesmus subspicatus</i>)
Stáří	Řasová suspenze pro testování se odebírá z exponenciální fáze růstu.
Sledování odezva:	Inhibice růstu biomasy řas.
Podmínky testu:	
Teplota	27 ± 2 °C
Osvětlení	Kontinuální, 6 000 lux, max. 10 000 lux.
Délka expozice	Norma doporučuje 72 hod. Důležité je však kultivovat suspenzi až po dosažení stacionární fáze růstu. Hodnocení růstu kultury se provádí jednou za 24 hod.
Množství testovaného roztoku	250 ml
Inokulum	$100\,000$ buněk · ml ⁻¹
Počet paralelních stanovení	5
Ostatní podmínky	Bez aerace, promíchávání řasové suspenze alespoň třikrát denně.
Chemikálie:	Testovaná látka, zřed'ovací voda připravená podle ISO 8692.
Pomůcky a zařízení:	Kultivační nádoby: mikrotitrační destičky – 96 jamek/300 ml, světelný mikroskop, počítač komůrka Cyrrus II, autokláv, pipety, odměrné baňky, pH metr, spektrofotometr na mikrotitrační destičky. Termoluminiscenční

2.5.9 Podmínky validity zkoušky

Zkouška je považována za platnou, pokud jsou splněny následující podmínky:

- Variační koeficientů růstových rychlostí u kontrolního vzorku nesmí být větší jak 5%
- Hodnota pH v kontrolním vzorku nesmí vzrůst o více než 1,5 jednotky v porovnání s hodnotou pH v růstovém médiu.
- Průměrná růstová rychlost kontrolního vzorku musí být minimálně 1,4 d⁻¹. To znamená rychlost přírůstku hustoty buněk 67krát za 72 hodin. [13,37]

2.5.10 Vyhodnocení řasového testu

Výsledky řasového testu se dají vyhodnotit metodami přímými nebo nepřímými. Mezi přímé metody se řadí kvantifikace počtu buněk (mikroskopicky, flow-cytometricky), gravimetricky, objemovou biomasou (pomocí centrifugace v kalibrovaných zkumavkách).

K nepřímým metodám patří stanovení spalného tepla na mikrokalořimetru, CHN analýza, Kvantifikace chlorofylu, kvantifikace enzymatické aktivity a stanovení rychlosti příjmu důležitých živin. Dále je využíváno hodnocení fotosyntetické asimilace a měření změny pH roztoku. Každá z těchto metod má své přednosti i nevýhody a tudíž své uplatnění pro různé druhy vzorků. [36]

Pro vyhodnocení řasového testu je třeba sestavit růstové křivky na základě nárůstu biomasy v jednotlivých testovaných koncentracích a v kontrole. Inhibice růstu řas se dá vyhodnotit dvěma níže uvedenými způsoby

Integrační metoda

Při tomto výpočtu je srovnáván nárůst biomasy řas v jednotlivých testovacích koncentracích a kontrole. Poměr mezi nárůstem v testované koncentraci a kontrolní suspenzi se vyjádří v procentech. Získané hodnoty vyjadřují inhibici celkového nárůstu biomasy v důsledku působení sledované toxické látky během sledovaného období. Výpočet spočívá v určení a následném porovnání ploch pod růstovými křivkami pro jednotlivé testované koncentrace.

Rovnice na výpočet plochy pod růstovou křivkou řasové kultury

$$A_i = \frac{(c_1 - c_2) \cdot t_1}{2} + \frac{(c_1 + c_2 - 2c_0)(t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(c_{n-1} + c_n - 2c_0)(t_n - t_{n-1})}{2} \quad (1)$$

- A_i plocha pod růstovou křivkou pro danou koncentraci
- c_0 jmenovitá počáteční koncentrace cenobií [$\text{ks} \cdot \text{ml}^{-1}$]
- c_1 změřená koncentrace cenobií v čase t_1 [$\text{ks} \cdot \text{ml}^{-1}$]
- c_n změřená koncentrace cenobií v čase t_n [$\text{ks} \cdot \text{ml}^{-1}$]
- t_1 doba prvního měření od počátku testu [hod.]
- t_2 doba n-tého měření od počátku testu [hod.]

Inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxické látky se zjišťuje na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami vzorku s přídavkem a bez přídavku toxikantu. Pokud by vyšla záporná hodnota, jedná se o stimulaci.

Rovnice výpočtu inhibice nárůstu biomasy řas

$$I_i = \frac{(A_c - A_i) \cdot 100}{A_c} [\%] \quad (2)$$

- A_i průměrná plocha pro danou koncentraci toxikantu
- A_c průměrná plocha pro kontrolní vzorek, (nulová koncentrace toxikantu)
- I_i inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxikantu, zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami.

Metoda výpočtu růstové rychlosti

Tento výpočet je založen na porovnání růstové rychlosti kontroly s rychlostí jednotlivých testovaných koncentrací. Poměr mezi rychlostmi je vyjádřen procentuálně a odpovídá inhibici růstu řas v důsledku působení námi sledované toxické látky.

Takto získané hodnoty popisují vliv působení toxikantu na rychlost nárůstu biomasy řas. Růstová rychlost je určena na základě dosažené koncentrace řas na konci expozice. Rychlost růstu určíme podle následující rovnice.

Rovnice pro výpočet růstové rychlosti řasové suspenze pro celou dobu kultivace

$$\mu_i = \frac{(\ln N_n - \ln N_0)}{t_n} \quad (3)$$

- μ_i růstová rychlost pro danou koncentraci
 N_n poslední naměřená hustota suspenze [$\text{ks} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 N_0 jmenovitá počáteční hustota suspenze [$\text{ks} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 t_n doba posledního měření od začátku zkoušky [hod.]

Pro přesnější výsledek je možno použít výpočet průměrné růstové rychlosti pomocí následujícího vzorce.

Rovnice pro výpočet přesnější růstové rychlosti zohledňující počet měření

$$\mu_i = \frac{\ln\left(\frac{N_1 - N_0}{t_1 - t_0}\right) + \dots + \ln\left(\frac{N_n - N_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}\right)}{n - 1} \quad (4)$$

- n počet měření

Pro výpočet růstové rychlosti je využíván podobný vztah jako pro výpočet inhibice nárůstu biomasy.

$$I_{ir} = \frac{(\mu_c - \mu_i) \cdot 100}{\mu_c} [\%] \quad (5)$$

- I_{ir} inhibice růstové rychlosti řas pro i -tou koncentraci toxikantu
 μ_i průměrná růstová rychlost testované koncentrace
 μ_c průměrná růstová rychlost kontroly

Tato metoda výpočtu vystihuje lépe vliv toxikantu na růst řas, než integrační metoda. Způsob výpočtu inhibic užívající růstových rychlostí je vhodný pouze v exponenciální fázi růstové křivky. Hodnoty z fáze poklesu, či stacionární fáze zatěžují výpočet chybou a neměly by ve výpočtu figurovat. Tato metoda se hodí pro krátkodobější expozici, pro zaznamenání trendů. [13,19,29,36]

Výsledek měření

Na základě získaných dat se sestrojí grafická závislost inhibice nárůstu biomasy. Dále se určí inhibice růstové rychlosti na logaritmu koncentrace toxikantu. Metodou nelineární regrese se následně určí hodnota EC_{50} s příslušnými intervaly spolehlivosti (95%).

Pokud by látka na řasy působila stimulačně, bude naměřena záporná inhibice. Toto nesmí být opomenuto a je potřeba to zdůraznit při závěrečném hodnocení. [19]

2.5.11 Využití řasového testu v praxi

Velmi dobré využití mají řasové testy pro testování látek, které se dostanou do vody. Jsou proto vhodné pro monitoring povrchových, podzemních a odpadních vod a vodních ekosystémů.

Dále jsou vhodné pro jakékoli environmentální vzorky a screeningové zkoušky. Při hodnocení toxicity neznámého vzorku je výhodné spojit řasový test s některou ryze analytickou metodou.

Řasa nám poskytne informace o souhrnné toxicitě vzorku a přesná analytická metoda zase přesné složení vzorku. Řasový test sám o sobě nemusí vždy odhalit toxické látky. Důvodem může být volba organismu, který není na danou látku tolik citlivý, nebo se látka může vyskytovat v neaktivní formě (v komplexu, kdy je toxicita např. těžkých kovů menší). Přesnou analýzou zase neodhalíme kombinativní účinky toxických látek. Dále jsou tyto testy využívány i na testování vzorků půdy, ačkoli je zde možnost využít testy toxicity s terestrickými producenty. [13,36,53]

3. APLIKACE TESTŮ

3.1 Kontaminanty ve vodním prostředí

V dnešní době se voda na zemském povrchu a pod ním již nenachází v čisté podobě. Lidskou činností se do ní dostalo značné množství rozpuštěných i nerozpuštěných látek, jimiž je voda kontaminována. Obsah a typ těchto látek se stále zvyšuje a to nad hygienicky přijatelnou mez. Ke znečištění vody dochází:

- **Z bodových zdrojů.** Představují města a obce, průmyslové závody a zemědělská a živočišná výroba.
- **Z plošných zdrojů.** Znečištění ze zemědělské činnosti, smyvy z terénu (eroze) a atmosférická depozice
- **Z difúzních zdrojů.**
- **Při haváriích.** Havarijní znečištění je nejčastěji způsobeno dopravními nehodami, nebo nedodržením technologických postupů během procesu výroby. Havárie ovlivňují jakost povrchových a podzemních vod. Nejčastěji dojde k úniku ropy nebo jiných chemických látek. [1]

Zdroje znečištění ve vodách:

- **Odpadní vody.** Z lidských sídel se prostřednictvím odpadních vod dostávají do vody patogenní organismy, jako jsou viry, bakterie, prvoci i plísně.
- **Proces zpracování ropy, uhlí, výroba laků, barev, aplikace pesticidů v zemědělství.** Odtud se do vody dostává značné množství organických látek.
- **Zpracování rud a chemický průmysl.** Z těchto procesů se do vody dostávají nejvýznamnější představitelé anorganického znečištění. Jedná se o soli různých toxických kovů (Hg, Cu, Zn, Ni, Cr, Cd atd.). Tyto soli jsou často vázány na nerozpustné částice, s nimiž sedimentují a představují tak významný toxický potenciál i po uplynutí řady let. [1]

3.1.1 Anorganické kontaminanty ve vodách

Ve vodách se nachází většina přirozeně se vyskytujících kovů a polokovů, které tvoří periodickou soustavu prvků. Při posouzení znečištění se klade důraz zejména na zastoupení skupiny těžkých kovů, které budou podrobně rozebrány v samostatné kapitole. Mezi nejčastější anorganické látky ve vodách patří sloučeniny síry, fosforu a dusíku.

Dále zde nacházíme radioaktivní látky, neelektrolyty a výrazné zastoupení mají látky ve formě kationtů. [31,32]

3.1.2 Organické kontaminanty ve vodách

Mezi nejznámější organické látky ve vodě patří pesticidy, tensidy, karcinogenní látky, lignin a ligninsulfonové kyseliny, huminové látky, třísloviny, fenoly a polyfenoly, uhlovodíky (ropné látky) chlorované organické látky.

Organické látky do velké míry ovlivňují biologické a chemické vlastnosti vod. Mohou být mutagenní, karcinogenní, alergenní nebo teratogenní. Významnou skupinu tvoří komplexotvorné látky, které ovlivňují formu výskytu kovů ve vodách (brání odstraňování kovů z vody srážením, adsorpcí nebo oxidací). Ve vodě mohou být obsaženy i stovky organických látek.

Významné antropogenní a stále se zvyšující znečištění představují rezidua léčiv, které budou také rozebrány v samostatné kapitole. [31,32]

3.2 Těžké kovy

Nejvýznamnější skupinou anorganických polutantů jsou takzvané těžké kovy. Těžké kovy jsou definovány jako látky s měrnou hmotností větší jak $5000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, nebo jako látky, které se srážejí sulfidem sodným za vzniku málo rozpustných sulfidů. Název těžké kovy je často používán jako synonymum k toxické kovy, což ale není přesné. Výjimku tvoří například Berylium, které je toxický kov nikoli však těžký. Železo a mangan zas pro změnu mezi těžké kovy patří, ale neřadí se mezi toxické. Další významnou skupinou jsou tzv. esenciální kovy. Tyto kovy mají důležité biologické funkce a jsou běžnou součástí biomasy organismů, ale ve vyšších koncentracích mohou být toxické. Následující odstavce budou věnovány nejznámějším z nich [20,32].

3.2.1 Měď (Cu)

Vlastnosti, využití

Měď je načervenalý kujný kov s výbornou elektrickou a tepelnou vodivostí. Díky těmto vlastnostem nachází široké uplatnění především v elektrotechnice, jako elektrický vodič, nebo jako součást celé řady slitin (např. bronz nebo mosaz). Využívá se při výrobě střešních krytin, okapů, ale také trubek pro rozvod vody a některých technických plynů. Je odolná proti korozi, protože se na povrchu pokrývá vrstvičkou nazelenalého a zásaditého uhličitanu měďnatého, který měď chrání proti další korozi.

Zastoupení mědi v zemské kůře je poměrně vzácné 55 – 70 ppm (parts per milion = částic na jeden milion) ve vodě se její koncentrace pohybuje pouze na úrovni $0,003 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Nejčastější formou výskytu jsou sulfidy (chalkopyrit a chalkosin) z nichž se v důsledku rozkladu sulfidických rud může dostat značné množství mědi do vody.

Toxicita, zdroje v ŽP

Protože soli Cu^{2+} jsou obecně silně fungicidní, hubí houby a plísně, používají se přípravky s vysokým podílem modré skalice k ošetřování zemědělských plodin nebo osiva na ochranu proti houbovým a plísnovým infekcím. Měď je velmi toxická pro mnohé viry a bakterie. Dále je toxická pro ryby, u nichž se akumuluje v tkáních. Ve stopové koncentraci je měď pro živé organismy nesmírně důležitá. Vysoký příjem může naopak způsobit poškození jater a ledvin, nebo vznik anémie. Nedostatečný příjem způsobuje vypadávání vlasů, zhoršení metabolismu cukrů, zpomalení duševního vývoje, zhoršení kvality kostí a vaziva a stejně jako při nadbytku vznik anémie.

Zvýšenou koncentraci mědi v prostředí způsobují továrny, které se zabývají zpracováním mědi a v oblastech těžby. Ačkoli je měď velmi toxická pro vodní organismy, výskyt volné mědi většinou nepředstavuje v ekosystémech velký problém, díky vazbě do komplexů v půdě, čímž se značně snižuje její toxicita. [20,31,32,46]

3.2.2 Kadmium (Cd)

Vlastnosti, využití

Kadmium je bílý kov, který se vlastnostmi velmi podobá zinku. Přirozeně se v přírodě vyskytuje jen málo, poměrné zastoupení kadmia v zemské kůře je asi 0,15 – 0,2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Nejčastěji se uplatňuje při výrobě galvanických článků, dále jako přísada do různých slitin, jako lapač neutronů v jaderné elektrárně nebo jako antikorozní materiál. V neposlední řadě se využívá jako stabilizátor při výrobě plastů (PVC).

Toxicita, zdroje v ŽP

Sloučeniny kadmia jsou mimořádně jedovaté a to z velké části proto, že tvoří i organické sloučeniny. Kadmium nepatří mezi esenciální prvky a ani v malém množství nesmí být podceňováno.

V živém organismu je kadmium eliminováno velmi pomalu. V lidském těle dochází k hromadění a to především v ledvinách a játrech. I velmi malá dávka může způsobit selhání ledvin. V játrech je vázáno 80-90% kadmia, které už nemůže působit toxicky, protože zde dochází k syntéze methalothioneinu. V krvi se vyskytuje jen málo kadmia, ale to může být nebezpečné pro vyvíjející se plod. Velmi nebezpečná vlastnost kadmia je vytěsňování Zinku z různých enzymů a tím pádem porušování průběhu metabolických reakcí. Významný antropogenní zdroj jsou fosforečnanová hnojiva aplikace čistírenských kalů. Dalším zdrojem kadmia jsou průmyslové odpadní vody z galvanického pokovování. [20,31,32,46]

3.2.3 Rtuť (Hg)

Vlastnosti, využití

Rtuť se nejčastěji vyskytuje ve sloučeninách v minerálech. Elementární rtuť je vzácná. Nejčastěji se vyskytuje v sulfidických rudách. Nejvýznamnějším sulfidem rtuti je rumělka (cinabarit, HgS), která je jejím hlavním průmyslovým zdrojem. Rtuť je často využívána jako katalyzátor při organických syntézách a v rudných úpravách

Toxicita, zdroje v ŽP

Toxicita rtuti závisí na její formě. Methylrtuť a její sloučeniny (organické formy rtuti) jsou hodnoceny IARC jako možné karcinogeny pro člověka (skupina 2B), zatímco elementární rtuť a její anorganické sloučeniny nejsou klasifikovány jako látka karcinogenní.

Rtuť je velmi toxická látka, jejímž vlivem dochází ke zničení či porušení struktury bílkovin v buňkách. Její nebezpečnost se opět liší podle formy. Organické sloučeniny rtuti mají mimořádně velkou schopnost hromadit se v organismech a přenášet se dále potravním řetězcem.

K Největším zdrojem rtuti v životním prostředí je chemický průmysl, a to zejména chemické podniky, ve kterých se rtuť používá při výrobě alkalických hydroxidů a chloru. K velkým zdrojům emisí rtuti do ovzduší patří také tepelné elektrárny spalující uhlí, dále spalovny odpadů, krematoria, hutní a koksárenské provozy. [20,31,32,46]

3.2.4 Zinek (Zn)

Vlastnosti, využití

Zinek je středně tvrdý křehký modrobílý kov, na lomu krystalický a lesklý. Je stálý na vzduchu, protože se pokrývá tenkou vrstvičkou oxidu zinečnatého. V přírodě se vyskytuje pouze ve sloučeninách, z nichž nejznámější jsou minerál sfalerit a kalamín. Používá galvanické pozinkování různých korodujících předmětů. Může se také využívat na výrobu galvanických článků nebo na výrobu různých slitin (mosaz-slitina mědi a zinku). V chemii je využíván také na vytěsnění vodíku z kyselin.

Toxicita, zdroje v ŽP

Zinek je velmi důležitou součástí enzymů, dále je důležitý pro správnou funkci imunitního systému a jako součást antioxidantních procesů. Jeho nedostatek může způsobit nemalé množství zdravotních problémů, mezi něž patří zpždění růstu, dermatitida, atrofie varlat a anorexie.

Při velkém překročení doporučené dávky může dojít k žaludečním křečím, nevolnosti a zvracení. Konzumace vysokých dávek zinku po dlouhou dobu (několik měsíců) může způsobovat anémii a poškození slinivky. Je známa jeho toxicita pro ryby a jiné vodní organismy.

Mezi největší zdroje zinku patří hlavně podniky barevné metalurgie. Zvýšené hodnoty zastoupení ve vodách může být způsobeno vypouštěním zinku a dalších kovů z továren, s odpadními vodami z domácností. Při dešti může být splachován z půdy.

Hodnoty zinku v půdě rostou hlavně kvůli ukládání odpadů z továren a uhelného popílku elektráren. [20,31,32]

3.2.5 Chrom (Cr)

Vlastnosti, využití

Chrom je prvek, který se běžně vyskytuje v přírodě. Nejčastější formou je chrom (Cr^0), trojmocný chrom (Cr^{III}) a šestimocný chrom (Cr^{VI}). Cr^{VI} a Cr^0 vznikají průmyslovou cestou. Sloučeniny trojmocného a šestimocného chromu, vyráběné v chemickém průmyslu, jsou využívány k chromování, výrobě barev a pigmentů, k ochraně dřeva a při zpracovávání kůží.

Toxicita, zdroje v ŽP

Trojmocný chrom se přirozeně vyskytuje v životním prostředí a je důležitou živinou pro lidský organismus. Napomáhá působení inzulínu v lidských tkáních a tak napomáhá zpracování cukrů bílkovin a tuků. Nejnebezpečnější je šestimocný chrom, který je klasifikován jako karcinogenní. U zvířat byly pozorovány vlivy na dýchací ústrojí při větších koncentracích chromu.

Znečištění chromem mohou způsobit odpadní vody ze závodů zabývajících se chromováním, ze strojírenství (výroba neželezných slitin, nekorodující oceli) a papírenství. Dalším zdrojem může být odpad z galvanického pokovování, zpracování kůží. Z výroby barev a pigmentů a textilní výroby se může uvolňovat trojmocný a šestimocný chrom do vodních toků. [20,31,32,47]

3.2.6 Olovo (Pb)

Vlastnosti, využití

Olovo je nejrozšířenějším kovem v rámci skupiny těžkých kovů. Je to šedomodrý, měkký, tažný a dobře tvarovatelný kov. Jen málokdy se vyskytuje v ryzí formě v přírodě. Nejčastěji se nachází ve sloučeninách anglesitu, cerrusitu a galenitu. Využívá se při výrobě akumulátorů, přidává se do skla, různých slitin a pájek. Dále je využitelné ve výrobě antikorozních nátěrů. Nejvýznamnější sloučeninou je olova je organické tetraethylolovo, které se přidává do benzínů. Jeho spotřeba se výrazně snížila po zavedení bezolovnatých paliv.

Toxicita, zdroje v ŽP

Anorganické sloučeniny olova patří do skupiny pravděpodobně karcinogenních látek pro člověka. Organické sloučeniny olova jsou označeny jako karcinogenní pro člověka. Nebezpečnost olova je dána tím, že se při vyšších dávkách hromadí v kostech, játrech a ledvinách. Dlouhodobá expozice byt v malých dávkách může vést k poruchám chování dětí, např. hyperaktivitě nebo snížení IQ. Hlavními zdroji olova jsou sklářský průmysl, elektrotechnický průmysl, chemický a strojírenský průmysl. Dalším zdrojem olova je výroba pyrotechniky nebo zpracování kovového odpadu. Znečištění je dále způsobeno prašnými emisemi z těžby a zpracování olovnatých rud. Stále významnějším antropogenním zdrojem olova se stávají výfukové plyny z paliv motorových vozidel. [20,31,32]

Využití řasových testů k zhodnocení toxických účinků těžkých kovů

Každá řasa je jinak citlivá a může vykazovat rozličné reakce na určité látky. Byly provedeny studie s různými druhy řas, u nichž byla předpokládána velmi podobná citlivost. Výsledky však poskytly velmi odlišné odezvy. Můžeme tedy říct, že žádný druh nemůže být použit jako jediný univerzální zástupce dané taxonomické skupiny. [48]

Následující tabulka pochází z jiné studie, ale výstižně znázorňuje různou citlivost několika druhů řas na těžké kovy.

Tab. 8 Srovnání pořadí toxicity těžkých kovů pro některé řasy [36]

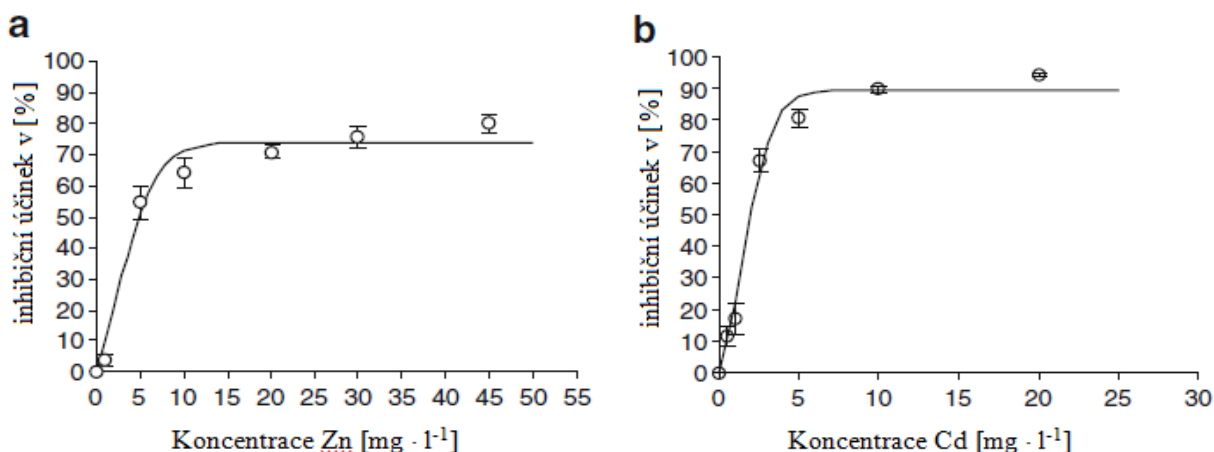
Řasa	Pořadí toxicity
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Cd > Pb > Cu > Ni / Zn
<i>Sc. quadricauda</i>	Cu > Ni > Cd > Pb > Zn > Co > Cr
<i>Sc. quadricauda</i>	Cd > Cr > Al > Co > Ni > Cu > Pb > Zn > Fe
<i>Sc. subspicatus</i>	Cd > Cr > Al > Co > Ni > Cu > Zn / Pb > Fe
<i>Scenedesmus</i> sp.	Cd > Ni > Se > Cu > Pb
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Cu > Ni > Co > Cr > Cd > Zn
<i>R. capitata</i>	Cd > Cu > Co > Cr / Al > Ni > Pb > Fe > Zn
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd > Cu > Hg > Zn > Pb
<i>Chl. kessleri</i>	Cu > Cr / Al > Cd > Zn > Co > Ni > Pb > Fe
<i>Chl. protothecoides</i> [pH 6.5]	Hg > Th > Cu > Cr > Se > Cd > Ni > Co
<i>Chl. saccharophila</i> [pH 6.5]	Se > Cu > Hg > Th > Cr > Cd > Ni > Co.
<i>Chl. saccharophila</i>	Cu > Zn > Cd > Pb
<i>Chlorella</i> sp.	Cd > Cu > Ni > Co > Pb
<i>Stichococcus bacillaris</i> [pH 6.5]	Hg > Cu > Se > Th > Cr > Ni > Co > Cd
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cu > Hg > Pb > Cd
<i>Cladophora glomerata</i> [pH 5.5]	Cr > Pb > Cu > Cd > Ni > Co > Zn
<i>Cl. glomerata</i> [pH 8.5]	Cr > Pb > Zn > Cu > Cd > Ni > Co
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Hg > Cu > Pb > Cd

3.3 Využití řasových testů k zhodnocení toxicity těžkých kovů (kadmia a zinku)

Vodní prostředí je často kontaminováno těžkými kovy, které účinkují na vodní řasy a posléze mohou způsobit otravy na vyšších trofických úrovních. Tato studie se zabývá toxicitou kadmia a zinku s využitím dvou testovacích organismů a to řas *Scenedesmus obliquus* a *Desmodesmus pleiomorphus*, které byly vybrány ze znečištěné oblasti v severním Portugalsku. Tato oblast byla dlouhou dobu kontaminována těžkými kovy, a to olovem (přibližně 835 mg · kg⁻¹) a rtutí (přibližně 66 mg · kg⁻¹) a zinkem (až do hodnot 3620 mg · kg⁻¹). Koncentrace kadmia byla pod detekčním limitem.

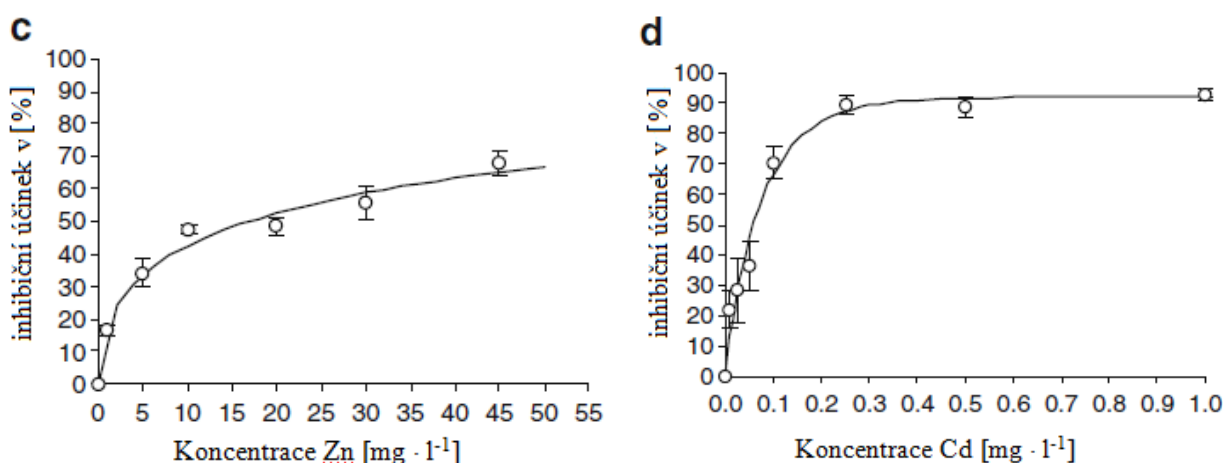
Tyto řasy byly dále kultivovány a použity v následující studii toxických účinků kadmia a zinku. Po dobu 96 hodin byla měřena inhibice růstu řas v důsledku kontaminace těžkými kovy (Cd a Zn)

Zajímavostí je, že na počátku expozice se zinkem se u řas projevila stimulace růstu. Je to dáno tím že, se jedná o biogenní prvek, který na organismy působí pozitivně, ve vyšších koncentracích je však toxický, a to bylo dokázáno následujícími testy. Kadmium nemělo žádný pozitivní účinek, nejedná se totiž o biogenní prvek a byly sledovány pouze toxické účinky. [51]



Obr. 11: Závislost inhibice růstu řasy *Scenedesmus obliquus* na koncentraci těžkých kovů Zn (obr. a) a Cd (obr. b) [51]

Obrázky **a** a **b** znázorňují vliv kovů (Zn, Cd) na řasu *Scenedesmus obliquus*. Z obrázku je patrné, že toxičtější působilo kadmium než zinek. Kadmium způsobilo rychlejší inhibici růstu a to při nižších koncentracích než zinek.



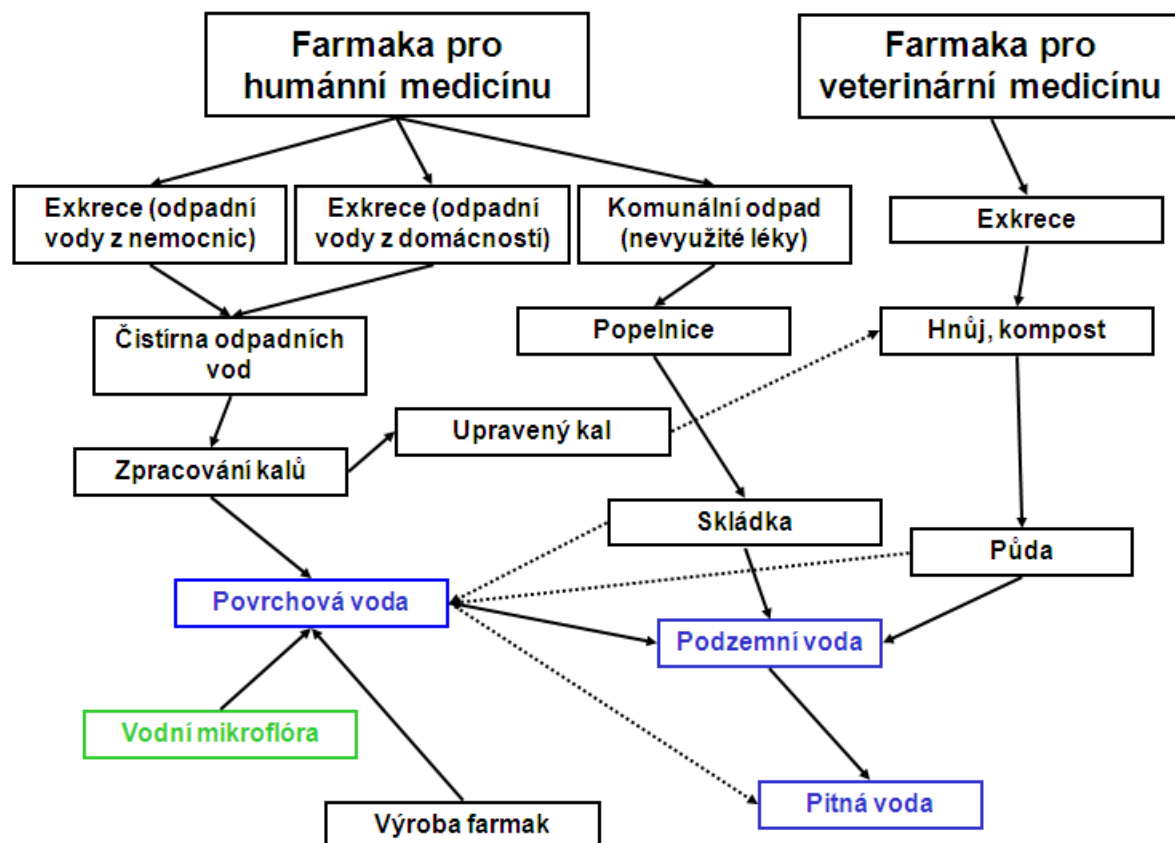
Obr. 12: Závislost inhibice růstu řasy *Desmodesmus pleiomorphus* na koncentraci těžkých kovů Zn (obr. c) a Cd (obr. d) [51].

Obrázek č. 12 **c** a **d** znázorňuje účinek kovů (Zn, Cd) na řasu *Desmodesmus pleiomorphus*. Z obrázku je patrné, že kadmium působilo mnohem toxičtější na tuto řasu než zinek. Již v řádu desetin mg · l⁻¹ došlo k výrazné inhibici růstu. Zinek nedosáhl takové míry toxického účinku jako kadmium a to ani při mnohonásobně vyšších koncentracích. Zároveň zde vidíme různé odezvy na tyto toxické kovy. Řasa *Scenedesmus obliquus* reagovala citlivěji na zinek než *Desmodesmus pleiomorphus*. V případě kadmia tomu bylo naopak, zde reagovala a to výrazně citlivěji řasa *Desmodesmus pleiomorphus*.

Důležitý poznatek z této studie je, že, každý organismus má specifické reakce a tolerance k toxickým látkám. Pro kvalitní studii je proto důležité použití širšího spektra testovacích organismů. [51]

3.4 Léčiva

Léčiva patří v současné době k významným látkám znečišťující životní prostředí. Velké množství z nich se dostává do vodního ekosystému a toto množství se stále zvyšuje. Platí to hlavně pro anestetika, antibiotika, hormony a také pomocné látky (plniva, pigmenty, vosky, tmelící látky). Tyto látky se do vody dostávají z různých zdrojů. Mezi nejčastější zdroje patří exkrece po požití léčiv u lidí i zvířat, úniky z výroby, apod. [42]



Obr. 13: Zdroje farmak v životním prostředí [42].

3.4.1 Diklofenak

Charakteristika

Je neužívanější látkou ze všech derivátů kyseliny octové. Má středně silný protizánětlivým a mírným antipyretickým účinkem. Nežádoucí účinky jsou poměrně mírné a vykazuje toleranci s trávicím ústrojím. Nejčastěji se využívá při svalových bolestech, ale i jako běžné analgetikum.

Všechny deriváty kyseliny octové jsou nesteroidní látky se zbytky kyseliny octové v molekule. Jsou považovány za relativně účinné látky. Intenzita nežádoucích účinků jednotlivých látek je velmi odlišná. Diklofenak patří v rámci této skupiny k léčivům s mírnějšími nežádoucími účinky. [41]

Dopady na vodní organismy

Akutní toxicita pro vodní organismy je $100 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. V koncentracích $25 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ dojde k značné redukci fytoplanktonu. Byly provedeny testy chronické toxicity na pstruhu duhovém po dobu 28 dní. Při koncentraci $1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ byly zaznamenány cytologické změny na játrech, ledvinách a žlábrách. Po zvýšení koncentrace na $5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ se objevily léze na ledvinách a skřelích a dále nastala vysoká bioakumulace v játrech.

Další ekotoxikologické testy prokázaly účinky sodné soli diklofenaku při testování imobilizace na *Daphnia magna*. Tento test byl proveden v rozsahu 48hodin a zjištěná hodnota EC_{50} byla $68,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Test inhibice sladkovodní řasy *Desmodesmus subcapicatus* prokázal hodnotu EC_{50} $72,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejcitlivější odezvu měl test na *Okřehku menším*, kde hodnota EC_{50} byla $7,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [42,43]

3.4.2 Ibuprofen

Charakteristika

Mezi neužívanější deriváty kyseliny propionové patří ibuprofen. Jedná se o velmi běžné analgetikum využívané při bolestech hlavy zubů a dalších bolestech. Díky dobrým antipyretickým účinkům je využitelný i při různých hořčnatých onemocněních.

Protizánětlivé účinky jsou spíše mírné a k jejich dosažení je potřeba překročit běžnou analgetickou dávku. Velkou předností celé skupiny derivátů kyseliny propionové je dobrá snášenlivost a malé nežádoucí účinky. Mají krátký poločas eliminace, musí se podávat několikrát denně a zároveň nehrozí kumulace. [41]

Dopady na vodní organismy

Při pokusu na rybě *Medace japonské* (*Oryzias latipes*) byla zjištěna zvýšená produkce vajíček a zvětšená játra. Testy na *Dafniích* vykázaly redukci populací při koncentracích $0 - 80 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Zkouška růstu *Okřehku menšího* po dobu 7 dní a koncentraci $1 - 1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ prokázala inhibici růstu. V dalších ekotoxikologických testech byla zkoumána sodná sůl ibuprofenu a zjištěny hodnoty EC_{50} pro vybrané organismy. V případě testu na *Dafniích* byla naměřená hodnota EC_{50} po 48 hodinovém testu $108,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro řasový test na organismu *Desmodesmus subcapicatus* byla zjištěna hodnota EC_{50} $315,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejcitlivěji z této trojice opět vyšel test na okřehku menším s hodnotou EC_{50} $22,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. [42,43]

3.5 Využití řasových testů k studii celkové toxicity směsí léčiv

Studie z posledních let ukazují, že farmaka lze již detekovat ve vodním prostředí. Tyto látky je možné detekovat v řekách, stokách a v malém množství i v pitné vodě. Mezi detekovanými látkami jsou nesteroidní protizánětlivé léky, zahrnující také analgetika, která tvoří celosvětově nejdůležitější skupinu léčiv s roční produkcí několika kilotun. Studie kombinativních účinků jsou velmi důležité, protože v přírodě se tyto látky běžně vyskytují ve směsi a ne jako jednotlivé kontaminanty. [43,50]

Následující studie se zabývá smíšenou toxicitou protizánětlivých léčiv, a to konkrétně diklofenakem, ibuprofenem, naxoprofenem a acetylsalicylovou kyselinou. Jako testovací organismy byly použity *Daphnia magna* a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Nejprve se testovaly jednotlivé účinky testovaných látek na dafniích a řasách. Byly stanoveny hodnoty EC_x (5,10,20,50,80) pro jednotlivé látky samostatně. První byly tyto hodnoty zjištěny pro řasu *Pseudokirchneriella subcapitata*. Výsledky shrnuje následující tabulka č. 9.

Tab. č. 9 Naměřené efektivní koncentrace s 95% intervalem spolehlivosti při testu léčiv na řasách [50]

Látka	EC ₅ (mg · l ⁻¹)	EC ₁₀ (mg · l ⁻¹)	EC ₂₀ (mg · l ⁻¹)	EC ₅₀ (mg · l ⁻¹)	EC ₈₀ (mg · l ⁻¹)
Diklofenak	44,2 (35,7 – 50,5)	49,2 (41,2 – 55,2)	56,1 (48,8 – 61,9)	71,9 (65,5 – 79,1)	92,2 (83,4 – 106,4)
Ibuprofen	72,9 (26,1 – 121,8)	102,7 (44,1 – 159,2)	155,5 (82,4 – 222,9)	342,2 (242,4 – 471,5)	753,2 (537,6 – 1323,2)
Naproxen	266,0 n.d.	321,5 n.d.	404,3 n.d.	625,5 n.d.	967,5 n.d.
ASA	86,4 (74,2 – 90,8)	90,6 (81,6 – 93,7)	95,8 (91,6 – 97,3)	106,7 (104,4 – 114,3)	118,9 (112,1 – 142,5)

n.d. - nezjistitelné

Poté byl ten samý test proveden s korýšem *Daphnia magna*, kde byly opět zjišťovány hodnoty efektivních koncentrací.

Tab. č. 10 Naměřené efektivní koncentrace a 95% intervalem spolehlivosti při testu léčiv na Dafniích [50]

Látka	EC ₅ (mg · l ⁻¹)	EC ₁₀ (mg · l ⁻¹)	EC ₂₀ (mg · l ⁻¹)	EC ₅₀ (mg · l ⁻¹)	EC ₈₀ (mg · l ⁻¹)
Diklofenak	10,0 n.d.	15,2 n.d.	25,5 n.d.	68,0 n.d.	181,3 n.d.
Ibuprofen	58,4 (43,9 – 77,7)	66,0 (51,7 – 84,1)	76,4 (62,9 – 92,9)	101,2 (89,2 – 114,9)	134,1 (117,0 – 153,6)
Naproxen	26,2 (11,4 – 60,5)	39,5 (20,2 – 77,4)	64,8 (39,9 – 105,3)	166,3 (130,5 – 211,9)	426,6 (274,5 – 663,0)
ASA	38,1 (25,4 – 57,1)	45,9 (32,9 – 63,9)	57,4 (44,6 – 73,9)	88,1 (72,8 – 106,6)	135,2 (100,4 – 182,1)

n.d. - nezjistitelné

Tyto hodnoty byly dále využity pro výpočet odhadovaného účinku směsi látky. Tento výpočet se nazývá metoda přídavku koncentrace a je vyjádřen rovnicí (6).

Rovnice - metoda přídavku koncentrace

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x_i}} = 1 \quad (6)$$

Poté byla provedena druhá zkouška. Tentokrát ne s jednotlivými léčivy zvlášť, ale s celou směsí. Jednotlivé látky byly nadávkovány tak že, byla použita čtvrtinová koncentrace, která způsobila dané EC_x z hodnot naměřených u samostatných testů. Tyto čtvrtinové podíly byly poté smíchány a proveden nový experiment s celou směsí. Koncentrace použité na druhý test znázorňují tabulky 11 a 12 opět pro oba testovací organismy. [50]

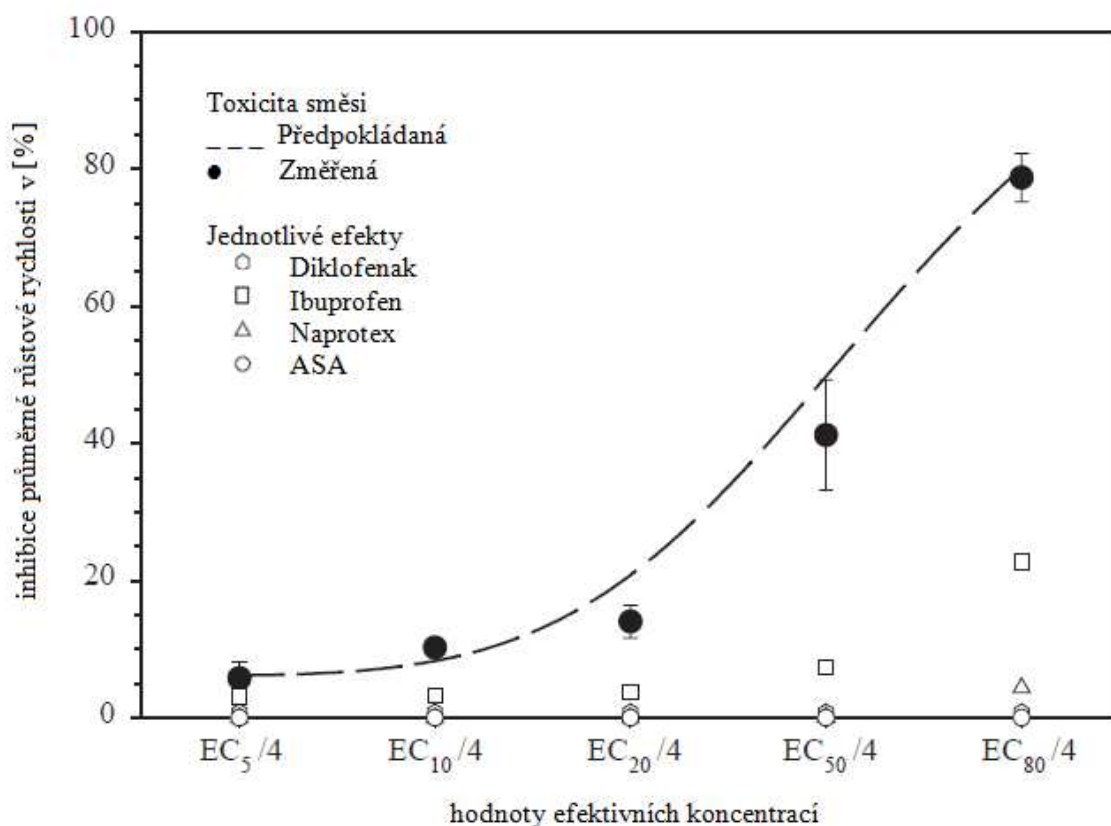
Tab. č. 11 Koncentrace testovaných léčiv ve směsi v řasovém testu, srovnání hodnot NOEC jednotlivých látek v [50]

Látka	EC ₅ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₁₀ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₂₀ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₅₀ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₈₀ /4 (mg · l ⁻¹)	NOEC (mg · l ⁻¹)
Diklofenak	11,1	12,3	14,0	18,0	23,1	50
Ibuprofen	18,2	25,7	38,9	85,6	188,3	32
Naproxen	66,5	80,4	101,1	156,4	241,9	100
ASA	21,6	22,6	24,0	26,7	29,7	32

Tab. č. 12 Koncentrace testovaných léčiv ve směsi na Dafnii, srovnání hodnot NOEC jednotlivých látek [50]

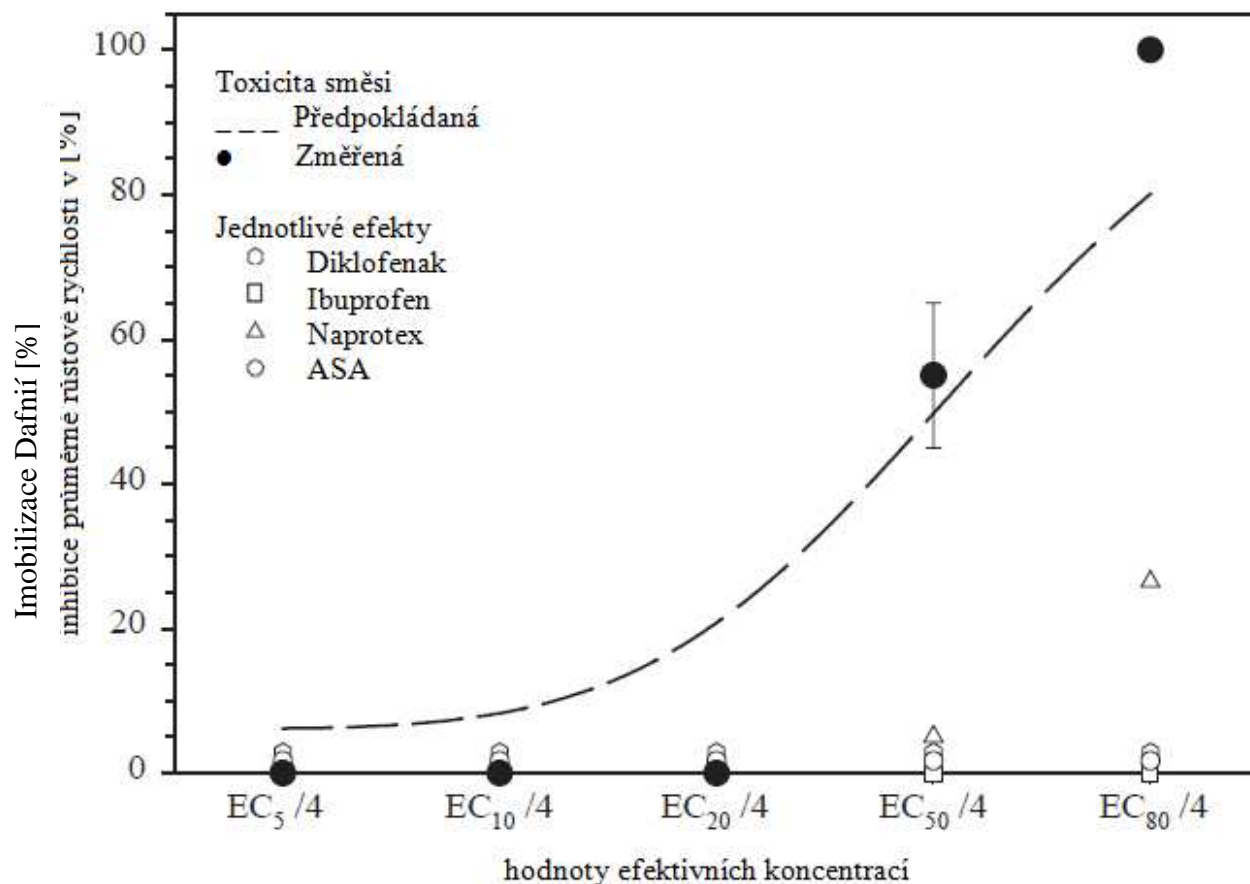
Látka	EC ₅ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₁₀ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₂₀ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₅₀ /4 (mg · l ⁻¹)	EC ₈₀ /4 (mg · l ⁻¹)	NOEC (mg · l ⁻¹)
Diklofenak	2,5	3,8	6,4	17,0	45,3	45
Ibuprofen	14,6	16,5	19,1	25,3	33,5	75
Naproxen	6,6	9,9	16,2	41,6	106,7	32
ASA	9,5	11,5	14,4	22,0	33,8	75

Výsledky testů se směsmi byly porovnány s předpovězenými hodnotami. Nejprve byly srovnány reálné a předpovězené účinky na zelené řase *Pseudokirchneriella subcapitata*.



Obr. 14 Porovnání předpovězených a naměřených hodnot pro směs léčiv na řase *Pseudokirchneriella subcapitata*. [50]

Graf ukazuje velkou podobnost mezi naměřenými a předpokládanými účinky. Pouze u hodnoty EC_4 naměřená hodnota překročila předpokládanou. A u hodnot EC_{20} EC_{50} je toxický účinek menší než předpokládaný. Poté byly srovnány změřené a předpokládané účinky na Dafniích.



Obr. 15 Porovnání předpovězených a naměřených hodnot pro směsi léčiv na koryši *D. magna*. [50]

Graf ukazuje, že ve srovnání s předpovězenými účinky jsou reálné účinky velmi malé pro hodnoty EC_5 , EC_{10} a EC_{20} . U vyšších hodnot efektivních koncentrací (EC_{50} , EC_{80}) jsou naměřené hodnoty výrazně vyšší než předpokládané. [50]

Důležitý poznatek z této studie je, že organismy opět vykazovaly různé reakce. V prvním případě test na řase *Pseudokirchneriella subcapitata* potvrdil relevanci použitého výpočtu a výsledky byly velmi podobné předpokládanému efektu. Druhý testovací organismus *Daphnia magna* vykázal velmi rozdílné naměřené efektivní koncentrace ve srovnání s výpočtem. [50]

4. ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala hodnocením ekotoxicity vybraných chemických látek s využitím řasových testů. V první části bakalářské práce byly rozebrány různé typy ekotoxikologických biotestů a jejich význam a nezastupitelnost při hodnocení toxicity látek. Práce byla podrobněji zaměřena na řasové testy a jejich aplikace. Řasové testy mají různé modifikace podle pokročilosti metody, doby trvání a použitých testovacích organismů. Byly zde popsány možnosti uspořádání, metodika a možné způsoby vyhodnocení řasového testu. Dále byly definovány podmínky validity zkoušky, které musí být dodrženy a faktory, které mohou ovlivňovat řasový test.

V druhé části práce byla rozebrána možná praktická využití řasových testů za pomoci výsledků z reálných studií. Byly zde podrobně probrány dvě skupiny vodního znečištění – organické a anorganické. Z anorganického znečištění jsme se podrobněji věnovali problematice těžkých kovů a organická část byla zaměřena na léčiva. Byl zde popsán význam těchto látek pro člověka, jejich využití, ale také možná rizika plynoucí z expozice a úniku do vodního prostředí. V rámci každé skupiny byly vybrány modelové studie, které dobře vystihovaly význam a využití řasových testů pro danou skupinu látek.

V práci byla shrnuta všechna možná využití řasových testů, mezi něž patří rychlé screeningové zkoušky, monitoring vod a vodních ekosystémů. Dále určení toxicity známých látek ve známé koncentraci, které bylo vysvětleno na praktickém příkladu. V této studii byly využity řasy *Scenedesmus obliquus* a *Desmodesmus pleiomorphus* k určení toxicity těžkých kovů kadmia a zinku. Testy na obou řasách prokázaly toxicitu obou kovů, z nichž bylo kadmium vyhodnoceno jako výrazně toxičtější. Obě řasy poskytly rozdílné reakce při shodném testu s vybraným kovem. *Scenedesmus obliquus* reagovala citlivěji na zinek než *Desmodesmus pleiomorphus*, zatímco v případě kadmia tomu bylo naopak.

Velmi užitečné se tyto testy ukázaly být pro určení toxicity směsi látek, protože i ve volné přírodě se tyto kontaminanty vyskytují ve směsích a jejich toxicita nemusí odpovídat prostému součtu jednotlivých složek. Této problematice se věnovala druhá modelová studie, která nejprve hodnotila toxicitu jednotlivých vybraných léčiv a poté celkovou toxicitu této směsi. Byla testována léčiva diklofenak, ibuprofen, naxoprofen a acetylsalicylová kyselina, které patří do skupiny proti-zánětlivých nesteroidních látek. K tomuto testu byly použity testovací organismy dvou trofických úrovní. K testu inhibice růstu řasy byla použita *Pseudokirchneriella subcapitata* a v testu imobilizace na perloočkách byla použita *Daphnia Magna*. I v tomto případě oba testy podaly různé výsledky. Při nižších dávkách směsi reagovala citlivěji řasa *Pseudokirchneriella subcapitata* než *Daphnia Magna*. Při vyšších koncentracích reagovala citlivěji *Daphnia Magna*. Oba testy však potvrdily předpoklad, že v tomto případě toxický efekt směsi je vyšší než součet dílčích efektů složek.

Tato práce slouží jako teoretický základ pro navazující diplomovou práci, kde bude jako náplň praktické části provedena obdobná studie na řasách k zhodnocení ekotoxicity látek.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PROKEŠ, J. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vydání. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2005. 248 s.
- [2] TICHÝ, M. *Toxikologie pro chemiky: Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 1. dotisk 2.vydání. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2004. 119 s.
- [3] *Ekotechnika* [online]. 2000 [cit. 2011-04-04]. TOXICITA.CZ. Dostupné z WWW: <www.toxicita.cz>.
- [4] MARŠÁLEK, B. *Mikrobiotesty : Druhá generace ekotoxikologických biotestů*. Brno : Botanický ústav AVČR, 2005. 42 s.
- [5] Řasy [on line], [cit. 23. 4. 2011]. Dostupné z: <http://www.gymh.cz/vyuka/biologie/prehledy/2bot_5_rasy.pdf>.
- [6] KOČÍ, V.; BENEŠ, H.; HAŠLER, P. Vliv mineralizace vzorku na citlivost řasového biotestu. *Czech Phycology* [online]. 2004, 4, [cit. 2009-05-10]. Dostupný z WWW: <http://fottea.czechphycology.cz/_contents/CP4-2004-18.pdf>.
- [7] LATALA, A.; SUROSZ, W. The effect of salinity on toxic influence of heavymetals towards planktonic green algae. *Biologia* 4. 1998, 53, s. 547-555.
- [8] AMBROŽOVÁ, J. *Mikroskopické praktikum z hydrobiologie*. první vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 183 s. ISBN 80-7080-496-3.
- [9] SVOBODOVÁ, Z., et al. *Ekotoxikologie-praktická cvičení: Testy toxicity na vodních organismech*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010. 84 s. ISBN 978-80-7305-120-4.
- [10] HÁJKOVÁ, T. *Využití řasových testů v ekotoxikologii*. Brno : Vysoké učení technické, 2010. 61 s. Diplomová práce. Fakulta chemická.
- [11] Ekotoxikologie. In *Katedra ekologie a ŽP* [online]. UPOL : [s.n.], 2009 [cit. 2010-06-10]. Dostupné z WWW: <<http://ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC>>.
- [12] ŠTĚPÁNKOVÁ, I. *Posouzení vhodnosti řasových testů pro hodnocení ekotoxicity*. Brno : Vysoké učení technické, 2009. 57 s. Diplomová práce. Fakulta chemická.

- [13] ČSN EN ISO 8692, Jakost vod: zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. Praha : Český normalizační institut, 2005. 17 s.
- [14] CHOVANEC, P. *Význam řasových testů v hodnocení ekotoxicity*. Brno, 2009. 33 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [15] ŘÍHOVÁ, AMBROŽOVÁ, J. *Encyklopedie hydrobiologie* [online]. Praha : VŠCHT, 2007 [cit. 2011-04-15]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/>.
- [16] *Desmodesmus subscapicatus* [on line], [cit. 20. 4. 2011]. Dostupné z: <<http://www.fnr.lu/en/Media/Images/NANEAU-Desmodesmus-subspicatus-magn-40x>>.
- [17] KOČÍ, V.; MLEJNEK, M.; BURKHARD, J. Statistické vyhodnocování řasových biotestů. *Czech Phycology* [online]. 2002, 2, [cit. 2009-05-09]. Dostupný z WWW: <http://fottea.czechphycology.cz/_contents/CP2-2002-17.pdf>.
- [18] MARŠÁLEK, B.; HILSCHEROVÁ, K. *Ekotoxikologické biotesty : Rozdělení, přehled, použití*. Brno : RECETOX, 2007. 38 s.
- [19] KOČÍ, V.; MLEJNEK, M. Řasový mikrobiotest. In *Ekotoxikologie* [online]. V Praze : [s.n.], 2008 [cit. 2010-05-04]. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/mikrometodaras.htm>>.
- [20] BESEDA, I.; SCHWARZ, Marián; BADIDOVÁ, Darina. *Toxikológia a ekotoxikológia*. první. Košice: Košice: TU v Košicích, Strojnická fakulta, 2009. 209 s. ISBN 978-80-553-0227-0.
- [21] AMBROŽOVÁ, J.; *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. druhé. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. 226 s. ISBN 80-7080-521-8.
- [22] Algaltoxkit [on line], [cit. 20. 3. 2011]. Dostupné z: < www.microbiotests.be >.
- [23] *Allium cepa* [on line], [cit. 11. 3. 2011]. Dostupné z: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-95452006000100002>.
- [24] *Pseudokirchneriella subcapitata* [on line], [cit. 20. 3. 2011]. Dostupné z: <<http://www.kbfi.ee/?id=213&lang=eng>>.

- [25] *Desmodesmus subcapitatus* [on line], [cit. 20. 3. 2011]. Dostupné z:
<<http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQCCAAuaWiu7HS-R20xOxGrUw3gEN0SvN5j5YcBo-h3Ln6eZzTjlg>>
- [26] *Dafnia magna* [on line], [cit. 24. 3. 2011]. Dostupné z:
<http://www.sciencephoto.com/images/download_lo_res.html?id=902300174>.
- [27] *Sinapis alba* [on line], [cit. 10. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://luirig.altervista.org/cpm/displayimage.php?album=34&pos=5568>>.
- [28] *Sinapis alba* [on line], [cit. 16. 4. 2011]. Dostupné z:
<http://www.vustah.cz/laboratore/zlatelab/images/sinapis_alba.jpg>.
- [29] Řasový test toxicity. In *Laboratorní návod č.2* [online]. Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT v Praze : Laboratoř ekotoxikologie a LCA, 2007 [cit. 2009-06-07]. Dostupné z WWW:
<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/2_rasy.pdf>.
- [30] KOČÍ, V. Statistické otazníky řasových biotestů. *Czech Phycology* [online]. 2001, 1, [cit. 2011-05-10]. Dostupný z WWW: <http://fottea.czechphycology.cz/_contents/CP1/CP1-2001-16.pdf>."
- [31] ŽÁČEK, L. *Hydrochemie*. první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTUM, 1998. 80 s. ISBN 80-214-1167-8.
- [32] PITTER, P. *Hydrochemie*. 3. - přepracované. Praha: VŠCHT, 1999. 568 s
- [33] *Poecilia reticulata* [on line], [cit. 20. 4. 2011]. Dostupné z:
<http://www.animalsholding.cz/photo.php?id=x_poecilia_reticulata.jpg&desc=&fotoname=Pav%C3%AD%20oko%20samec&adresar=zvirata>.
- [34] *Brachydanio rerio* [on line], [cit. 21. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://aqua-fish.com.ua/statya.php?vstat=167>>.
- [35] *Vibrio fischeri* [on line], [cit. 12. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://www.ou.edu/cas/botany-micro/faculty/pictures/vibrio.jpg>>.
- [36] MARŠÁLEK, B. *Řasové testy trofie a toxicity* Brno : RECETOX, 200?. 10 s.

- [37] OECD guideline for testing chemicals [on line], [cit. 10. 4. 2011]. Dostupné z: <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/free/9720101e.pdf> >.
- [38] Sinice a řasy [on line], [cit. 11. 4. 2011]. Dostupné z: www.sinicearasy.cz >.
- [39] MARŠÁLEK, B. Aktuální trendy v ekotoxikologii vodních systémů. In *Ekotoxikologické biotesty 4 : Sborník pracovní konference*. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2004. s. 5-7. ISBN 80-86832-03-1.
- [40] KOČÍ, V. Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. In *Ekotoxikologické biotesty 1 : Sborník pracovní konference*. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2002. s. 3-4. ISBN 80-238-9260-6
- [41] LINCOVÁ, D.; FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Univerzita Karlova v Praze: Galén, 2007. 601 s. ISBN 13:978-80-7262-373-0
- [42] POUZAR, M. Rezidua léčiv v životním prostředí. In *Speciální toxikologie* [online]. Fakulta chemicko-technologická Universita Pardubice : [s.n.], 2000 [cit. 2011-05-10]. Dostupné z WWW: www.mpouzar.net/prednasky/leciva.ppt >.
- [43] CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicology of pharmaceuticals including the assesment of combination effects. *Toxicology Letters*. 2003, 142, s. 185-194. [44] HOFFMAN, D.J., et al. *Handbook of ecotoxicology*. 2.nd . Boca Raton : CRC Press, 2002. 290 s. ISBN 9781-56670-546-2.
- [45] OECD [on line], [cit. 11. 4. 2011]. Dostupné z: <http://www.oecd.org/dataoecd/58/60/1946914.pdf> >.
- [46] HOLOUBEK, I. *Chemie životního prostředí IV : Polutanty s dlouhou dobou života v prostředí*. Brno : RECETOX - TOCOEN and Associates, 2004.
- [47] Chrom [on line], [cit. 11. 4. 2011]. Dostupné z: <http://www.eco-usa.net/toxics/chemicals/chromium.shtml> >.
- [48] ROJÍČKOVÁ-PADRTOVÁ, R.; MARŠÁLEK, B. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere*. 1984, 14, s. 3329-3338
- [49] ALTENBURGER, R.; KRUGER, J.; EISENTRAGER, A. Proposing a pH stabilised nutrient medium for algal growth bioassays. *Chemosphere*. 2010, 78, s. 864-870.

- [50] CLEUVERS, M. Mixture of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, noxoprofen, and bacetylsalic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2004, 59, s. 309-315.
- [51] MONTEIRO, C.M., et al. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *J Appl Phycol*. 2011, 103, s. 441-443.
- [52] PIOU, S., et al. Changes in geochemistry and ecotoxicity of Zn and Cd contaminated dredged sediment over time land disposal. *Environmental research*. 2009, 109, s. 712-720
- [53] WONG, S.L.; WAINWRIGHT, J.F.; PIMENTA, J. Quantification of total and metal toxicity in wastewater using algal bioassays. *Aquatic toxicology*. 1995, 31, s. 57-75.
- [54] *Phaeodactylum tricornutum* [on line], [cit. 15. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://bioinformatics.psb.ugent.be/genomes/view/Phaeodactylum-tricornutum>>.
- [55] Gradienty v laboratoři [on line], Lukavský J.[cit. 15. 4. 2011]. Dostupné z:
<http://fottea.czechphyecology.cz/_contents/CP1/CP1-2001-10.pdf>.
- [56] Toxoen [on line], [cit. 15. 4. 2011]. Dostupné z:
<http://www.tocoen.cz/sluzby_toxicita.htm>.
- [57] *Lemna minor* [on line], [cit. 11. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://cmuscmr.cmu.edu.tw/images/garden/021.jpg>>.
- [58] *Lemna minor* [on line], [cit. 1. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://luirig.altervista.org/cpm/albums/fitch3/wal-hoo01019-lemna-minor.jpg>>.
- [59] *Allium cepa* [on line], [cit. 17. 4. 2011]. Dostupné z:
<<http://www.homeoint.org/seror/cowperthwaite/cepa.htm>>.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ISO	International Organization for Standardization(Mezinárodní organizace pro normalizaci)
EN	Označení evropských norem
OECD	Organization for economic Co-operation and Development
U.S. EPA	U.S. Enviromental protection agency
EC50	Efektivní koncentrace zkoušeného vzorku, která má za následek určitou změnu chování u 50% testovacích organismů
IC50	inhibiční koncentrace, která představuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50% snížení růstové rychlosti.
LC50	letální koncentrace způsobující smrt 50% testovacích organismů
NOEC	koncentrace bez pozorovatelných účinků
LOEC	nejnižší pozorovatelná účinná koncentrace
$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	jednotka hmotnostní koncentrace
A_i	plocha pod růstovou křivkou pro danou koncentraci
c_0	jmenovitá počáteční koncentrace cenobií
c_1	změřená koncentrace cenobií v čase t_1
c_n	změřená koncentrace cenobií v čase t_n
t_1	doba prvního měření od počátku testu
t_2	doba n-tého měření od počátku testu
A_i	průměrná plocha pro danou koncentraci toxikantu
A_c	průměrná plocha pro kontrolní vzorek, (nulová koncentrace toxikantu)
I_i	inhibice nárůstu řas pro danou koncentraci toxikantu, zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami.
μ_i	růstová rychlost pro danou koncentraci
N_n	poslední naměřená hustota suspenze
N_0	jmenovitá počáteční hustota suspenze
t_n	doba posledního měření od začátku zkoušky
n	počet měření
I_{ir}	inhibice růstové rychlosti řas pro i-tou koncentraci toxikantu
μ_i	průměrná růstová rychlost testované koncentrace
μ_c	průměrná růstová rychlost kontroly